

Aus dem Pathologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Klinikum Westend
Vormaliger Direktor: Prof. Dr. med. V. Becker

Darstellung von Gastrin aus Schweinemägen
und seine Rückgewinnung aus Urin unter
besonderer Berücksichtigung eines fraglichen
Falles von Zollinger-Ellison-Syndrom

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Uwe Wüstling
aus Halle/Saale

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pathologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Klinikum Westend
Vormaliger Direktor: Prof. Dr. med. V. Becker

Darstellung von Gastrin aus Schweinemägen
und seine Rückgewinnung aus Urin unter
besonderer Berücksichtigung eines fraglichen
Falles von Zollinger-Ellison-Syndrom

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Uwe Wüstling
aus Halle/Saale

Referent: Frau Prof. Dr. S. Grohme

Korreferent: Herr Prof. Dr. W. Oelkers

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22. Januar 1976



Meiner Mutter in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. <u>Einleitung</u>	3
2. <u>Literatur</u>	4
2.1. Historischer Überblick	4
2.2. Chemie des Gastrins	5
2.3. Wirkungen des Gastrins	7
2.4. Bildung, Transport und Ausscheidung des Gastrins	8
2.5. Das Zollinger-Ellison-Syndrom	12
3. <u>Methodik</u>	16
3.1. Allgemeines	16
3.2. Extraktion des Gastrins aus Schweinemägen	17
3.3. Rückgewinnung von dem Urin zugegebenen Gastrin	23
3.4. Verarbeitung eines fraglichen Zollinger-Ellison-Urins	27
3.5. Tierversuche	29
4. <u>Ergebnisse</u>	30
4.1. Gastrinextraktion aus Schweinemägen	30
4.1.1. Stimulatorische Eigenschaften der Antrumextrakte auf verschiedener Reinheitsstufe	31
4.1.2. Stimulatorisches Verhalten nach chromatographischer Reinigung auf Sephadex G 50 und AE-Zellulose	34
4.2. Rückgewinnung von dem Urin zugegebenen Gastrin	39
4.3. Gastrinextraktion aus fraglichem Zollinger-Ellison-Urin	49
5. <u>Diskussion</u>	52
6. <u>Zusammenfassung</u>	57
Literaturverzeichnis	58
Nachsatz	64
Lebenslauf	65

1. Einleitung

Als ZOLLINGER und ELLISON im Jahre 1958 zeigen konnten, daß die bis dahin bereits häufiger beschriebene Koinzidenz von Inselzelladenomen des Pankreas und therapieresistenten Magen- bzw. Duodenalulzera mit atypischer Lokalisation nicht nur ein zufälliges Zusammentreffen darstellte, sondern daß die Beseitigung der Adenome zur Heilung der Ulkuskrankheit führte, stellte sich die Frage nach der kausalen Verknüpfung beider Erscheinungen, die inzwischen durch den Nachweis der Bildung von Gastrin durch den Inselzelltumor beantwortet werden konnte. Die von BONFILS, BADER, DUBRASQUET und LAMBLING (1963) erstmals publizierte und in den letzten Jahren von verschiedenen Autoren bestätigte Beobachtung, daß der Urin von Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom im Tierversuch eine deutliche Stimulierung der Magensaftsekretion zeigte, wurde als Folge der Wirkung des Gastrins bzw. von Gastrinbruchstücken gedeutet, die wegen ihrer hohen Konzentration im Serum teilweise über die Nieren ausgeschieden worden waren. Tatsächlich ergaben Aminosäureanalysen der säurestimulierenden Fraktion des Urins durch BONFILS, VATIER und ACCARY (1970) ein hohes Maß an Übereinstimmung mit dem Gastrinmolekül.

Auf Anregung von Herrn Dr. Hans-Peter Seelig wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das verhältnismäßig praktikable Verfahren der Darstellung von Gastrin mit Hilfe eines Anionenaustauschers (Diäthylaminoäthyl-Zellulose) auch für die Rückgewinnung geringer, dem Urin einer Normalperson hinzugefügter Gastrinmengen geeignet erscheint. Die dabei erzielten positiven Ergebnisse waren Anlaß für die Verarbeitung des Urins eines Patienten, bei dem differentialdiagnostisch das Vorliegen eines Zollinger-Ellison-Syndroms diskutiert wurde.

Die Reindarstellung des für die Durchführung der Versuche notwendigen Gastrins aus Schweinemägen erfolgte weitgehend nach der von GREGORY und TRACY (1964) veröffentlichten Methode, die für die Erfordernisse der Gastrinextraktion aus Urin allerdings in wesentlichen Punkten modifiziert werden mußte.

2. Literatur

2.1. Historischer Überblick

Die Kenntnis des Gastrins geht auf den Beginn des 20. Jahrhunderts zurück. In den Jahren 1905 und 1906 berichtete EDKINS über Untersuchungen, in denen es ihm gelungen war, bei Katzen mit intravenös injizierten Extrakten der Mukosa des Magenantrums eine deutliche Stimulierung der Salzsäuresekretion der Fundusdrüsen hervorzurufen. Er führte diese Wirkung auf ein in der Magenschleimhaut gebildetes Hormon zurück, das auf humoralem oder lymphogenem Wege Einfluß auf die Bildung der Salzsäure nehmen sollte, und bezeichnete es als Gastrin. Als aber in der Folgezeit (1910 und 1911) mit dem von BARGER und DALE entdeckten Histamin eine Substanz bekannt wurde, die in ihrer biologischen Wirkung ganz der des Gastrins entsprach, verließ man die von EDKINS postulierte Gastrin-Theorie wieder in der Annahme, daß das Histamin mit dem Gastrin identisch sei. Erst der Nachweis, daß h i s t a m i n f r e i e Antrumextrakte des Hundes eine salzsäurestimulierende Wirkung besaßen (KOMAROV, 1938 und 1942), ließ die Existenz des Gastrins wieder wahrscheinlich werden. Seither konnten Rohextrakte dieses Hormons sowohl aus Mägen verschiedener Tiere wie Schwein, Katze und Rind (UVNÄS, 1943 und 1945; HARPER, 1946; JORPES, JALLING und MUTT, 1952) als auch aus Magenantra des Menschen (UVNÄS, 1945) gewonnen werden, ferner aus Gewebe von Inselzelltumoren des Pankreas beim Menschen (GREGORY, TRACY, FRENCH und SIRCUS, 1960; ZOLLINGER, ELLIOTT, ENDAHL, GRANT, GOSWITZ und TAFT, 1962). Den endgültigen Beweis für die Richtigkeit der Gastrin-Theorie von EDKINS lieferten jedoch GREGORY und TRACY im Jahre 1964, indem sie ein Verfahren zur Reindarstellung von Gastrin publizierten. Dadurch wurde noch im gleichen Jahr die Struktur- aufklärung (GREGORY, HARDY, JONES und SHEPPARD, 1964) und Synthese (ANDERSON, BARTON, GREGORY, HARDY, KENNER, McLEOD, PRESTON und SHEPPARD, 1964) des Moleküls möglich.

2.2. Chemie des Gastrins

Die von GREGORY und seinen Mitarbeitern durchgeführte Strukturaufklärung des Gastrins erfolgte zunächst aus Antrumextrakten von Schweinemägen, der sich aber sehr rasch Untersuchungen mit Mägen des Menschen und anderer Spezies anschlossen (GREGORY, TRACY, GROSSMAN, 1966; AGARWAL, KENNER und SHEPPARD, 1969). Die dabei gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Gastrin ist ein aus 17 Aminosäuremolekülen zusammengesetztes Polypeptid, dessen Molekulargewicht (MG) für die verschiedenen Spezies zwischen 2000 und 2200 schwankt. Das Fehlen bzw. das Vorhandensein einer Sulfatestergruppe am Tyrosinrest in der Position 12 macht die Unterscheidung in Gastrin I (ohne SO_3 -Gruppe) und Gastrin II (mit SO_3 -Gruppe) notwendig. Das MG von Gastrin I des Menschen beträgt 2096, das von Gastrin II 2175, der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,5. Die physiologische Wirkung bleibt von diesem Unterschied jedoch unberührt, da sie ausschließlich an das C-terminale Tetrapeptid Try-Met-Asp-Phe-NH₂ gebunden ist. Diese Erkenntnis stützt sich einmal auf den von GREGORY und TRACY 1964 geführten Nachweis, daß Gastrinbruchstücke, denen diese vier Aminosäuren fehlen oder bei denen die C-terminale Amidgruppe durch andere Reste ersetzt worden war, die Fähigkeit zur Säurestimulation verloren hatten. Zum anderen erwies sich das Tetrapeptid als quantitativ zwar schwächer, qualitativ jedoch genauso wirksam wie das gesamte Gastrinmolekül.

Dies führte zur synthetischen Produktion eines Pentapeptids, das unter dem Namen Pentagastrin Eingang in die Magendiagnostik gefunden hat. Es ist in der Lage, die Salzsäurestimulation des Gastrins zu imitieren, wobei allerdings höhere Konzentrationen erforderlich sind. MAKHLLOUF konnte zeigen, daß zu maximaler Magensaftproduktion beim Menschen 2 µg/kg Gastrin gegenüber 6 µg/kg Pentagastrin erforderlich sind.

Die am C-terminalen Ende des Gastrinmoleküls lokalisierte Amidgruppe verhindert den Abbau durch Carboxypeptidasen; vor der Wirkung der Aminopeptidasen ist das Gastrin durch den in

Ringform vorliegenden N-terminalen Glutamyrest geschützt. Charakteristisch für die Struktur des Gastrins ist der hohe Gehalt an Monoamino-dicarbonsäuren bei völligem Fehlen von basischen Aminosäuren oder Diamino-monocarbonsäuren. Im elektrischen Feld wandert Gastrin also anodenwärts, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von Gastrin II wegen der zusätzlichen Sulfatestergruppe größer ist als die von Gastrin I. Die unterschiedliche Ladung beider Moleküle ermöglicht deren Trennung mit Hilfe von Anionenaustauschern.

Artspezifische Modifikationen der molekularen Struktur beschränken sich lediglich auf die Aminosäuren der Positionen 5 bis 10. Vergleiche dazu Tabelle 1.

Gastrin	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Mensch	Glu	Gly	Pro	Try	Leu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Try	Gly	Try	Met	Asp	Phe-NH ₂
Schwein					-Met-												
Hund					-Met-			-Ala-									
Kaninchen					-Met-Ala-												
Katze											-Ala-						
Rind, Schaf					-Val-						-Ala-						

Tab. 1: Unterschiede der Struktur von Gastrin bei Mensch und Tier

2.5. Wirkungen des Gastrins

Gastrin gehört neben dem Sekretin und dem Cholezystokinin-Pankreozymin zu den sog. Gewebshormonen des Magen-Darm-Traktes. Ein Vergleich des Aufbaus der Moleküle läßt zumindest zwischen Gastrin und Cholezystokinin-Pankreozymin strukturelle Ähnlichkeiten am C-terminalen Ende erkennen, so daß die Vielfalt der durch Gastrin zu erzielenden biologischen Antworten des Organismus mit einer Überschneidung der Wirkungsspektren dieser beiden gastrointestinalen Hormone erklärt werden könnte (HALTER, 1969). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß der auf das Endorgan ausgeübte Effekt mit steigender Dosierung häufig gegenteilig wird, so daß eine Differenzierung zwischen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des Gastrins geboten erscheint.

Seine primäre biologische Funktion besteht in der Stimulierung der Salzsäuresekretion der Fundusdrüsen des Magens. Es ist unter physiologischen Bedingungen aber ferner in der Lage, die Pepsinsekretion des Magens geringfügig anzuregen. Auch ein Effekt auf die Bauchspeicheldrüse ist nachweisbar, und zwar betrifft er sowohl die Induktion der Fermentsekretion als auch die Erhöhung der Volumensekretion. Er ist fast genauso groß wie unter der Einwirkung von Cholezystokinin-Pankreozymin. Dagegen ist die Inhibition der Magensaftsekretion, die Erhöhung von Tonus und Motilität des Magens, Dünndarms und der Gallenblase sowie die hypotensive Wirkung auf den Kreislauf nur mit so hohen Gastrindosen zu erzielen, daß sie dem pharmakologischen Wirkungsbereich zugeordnet werden müssen.

2.4. Bildung, Transport und Ausscheidung des Gastrins

Die Beantwortung der Frage nach dem zellulären Äquivalent der Gastrinproduktion konnte bis in die Mitte der sechziger Jahre lediglich durch deskriptiv-morphologische Charakterisierung jener Zelltypen versucht werden, die als Orte der Gastrinbildung erkannt worden waren (CAVALLERO und SOLCIA, 1965; SOLCIA, VASSALLO und SAMPIETRO, 1967). Einen sicheren Nachweis für die Anwesenheit des Hormons innerhalb der Zelle gab es noch nicht.

Daher bedeutete die Gewinnung von Antikörpern gegen synthetisches Humangastrin einen wesentlichen Fortschritt, da diese - mit fluoreszierenden Partikeln beladen - einen immunhistologischen Nachweis intrazellulär lokalisierten Gastrins erlaubten (McGUIGAN, 1968). Die in der Folgezeit erschienenen Veröffentlichungen charakterisierten die gastrinbildende G-Zelle des Gastrointestinaltraktes folgendermaßen: sie ist die vorherrschende endokrine Zelle im Antrumbereich, mit hellem Zytoplasma, geringfügiger Tendenz zur Metachromasie mit Toluidinblau und nachweisbarer Argyrophilie. L-DOPA wird durch sie zu Dopamin decarboxyliert (SOLCIA, VASSALLO und CAPELLA, 1969; PEARSE, COULLING, WEAVERS und FRIESEN, 1970; BUSSOLATI und PEARSE, 1970; PEARSE und BUSSOLATI, 1970). Neuerdings werden diese Ergebnisse jedoch angezweifelt. Nach McGuigan und Greider (1971) sollen die gastrinbildenden Zellen des Magen-Darm-Kanals weder helles Zytoplasma noch argyrophil-metachromatische Eigenschaften besitzen. Dagegen bestätigen dieselben Autoren das Vorhandensein von Gastrin in den A₁-Zellen bzw. D-Zellen des normalen Pankreas vom Menschen (McGuigan und Greider, 1971). Eine Deutung dieser sich widersprechenden Beobachtungen muß abgewartet werden.

Unklarheit herrscht z.Z. auch noch über den molekularen Aufbau des zellulären und des im Blut kreisenden Gastrins. Wie schon unter 2.2. erwähnt, ermöglichte die von Gregory und Tracy (1964) beschriebene Methode die Strukturaufklärung des Hormons aus Antrumextrakten verschiedenster Spezies und wies es immer wieder als Heptadecapeptid aus. Dennoch berichteten Tauber und Madison bereits 1965 und 1966 über die Darstellung

eines Polypeptids mit salzsäurestimulierender Wirkung aus Schweinemägen und Zollinger-Ellison-Tumoren, das 107 Aminosäuremoleküle aufwies und ein MG von etwa 12500 besaß. Vergleiche mit dem bekannten Heptadecapeptid zeigten allerdings erhebliche Unterschiede, z.B. das Vorhandensein von basischen Aminosäuren und das Fehlen von Tryptophan, so daß ein Polymerisationsprodukt ausgeschlossen werden mußte. Als Erklärung für diese Befunde wurde eine höhermolekulare Gastrinvorstufe bzw. ein Gastrin-Trägerkomplex diskutiert (SEELIG, 1967). Neuere Untersuchungen scheinen diese Vermutungen zu bestätigen. Im Jahre 1970 gelangen GREGORY und TRACY der chromatographische Nachweis von Gastrin I und Gastrin II sowie einer stimulatorisch unwirksamen, hochmolekularen Polypeptidkomponente mit Hilfe von AE-Zellulose bei der Verarbeitung von Schweinemägen. Auch Untersuchungen von Gewebe des Magen-Darm-Traktes beim Menschen durch BERSON und YALOW (1971) ließen zwei Gastrinfraktionen erkennen: ein niedermolekulares Polypeptid (H-LG = heptadecapeptid-like gastrin) das inzwischen als das bekannte Heptadecapeptid identifiziert werden konnte, und eine größere Komponente (BG = big gastrin) mit einem MG von über 7000, die aus dem Heptadecapeptid und einem Trägermolekül zusammengesetzt zu sein scheint. Gestützt wird diese Annahme durch die Freisetzung des Heptadecapeptids aus der BG-Fraktion mit Hilfe von Trypsin (YALOW und BERSON, 1971).

Auch die Lokalisation beider Fraktionen erweist sich als sehr charakteristisch: die H-LG-Komponente dominiert in Extrakten der Antrum mucosa, während das BG - wenn auch in geringerer Konzentration - im Duodenum und proximalen Jejunum nachweisbar ist.

Die hier wiedergegebenen Ergebnisse können im Sinne einer intravasalen Bindung des Gastrins an Serumalbumine gedeutet werden, ein schlüssiger Beweis dafür liegt allerdings noch nicht vor. Eine Identität des BG-Moleküls mit dem von TAUBER und MADISON extrahierten Polypeptid ließ sich nicht nachweisen.

Messungen der Halbwertszeit des im Organismus von Hunden kreis-

senden radioaktiv markierten Gastrins ergaben Werte von etwa sechs Minuten und sprechen für einen raschen Abbau des Moleküls (McGUIGAN und LANDOR, 1971), ohne daß bislang eindeutige Aussagen über den physiologischen Abbauweg gemacht werden können.

Eine Fülle von Ergebnissen spricht für die Beteiligung der Leber:

- das häufig gleichzeitige Bestehen von peptischem Ulcus und Lebercirrhose (SCHRIEFERS, SCHREIBER und ESSER, 1963),
- Hypersekretion des Magens nach porto-cavaler Anastomose (LEBEDINSKAJA, 1933; ORLOFF, CHANDLER, ALDERMANN, KEITER und ROSEN, 1969),
- ein signifikanter Wirkungsverlust von Gastrin nach Injektion in die V. mesenterica (BEGER, WITTE, MEVES und KRAAS, 1971)
- bzw. nach intraportaler Injektion von synthetischem Human-gastrin (THOMPSON, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER, 1969),
- der fast vollständige Abbau von Pentagastrin nach Leberpassage (LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER, 1967; THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER, 1969) oder
- durch partikelfreie Überstände aus Rattenleberhomogenat (SEELIG, LINTHE, LÜDCKE, PLEWE, MÜLLER, WÜSTLING und KESSLER, 1970).

Andere Veröffentlichungen stellen die Inaktivierung des Gastrins durch die Leber in Frage:

- kein Nachweis eines signifikanten Wirkungsverlustes von Gastrinrohextrakten nach Leberpassage (GILLESPIE und GROSSMAN, 1962; LICK, WELSCH, HART, BRÜCKNER, BALSER und GÜRTNER, 1967),
- Erklärung der Wirkungsminderung aufgrund eines Verdünnungseffektes durch arteriellen Zustrom über die A. hepatica (McGUIGAN, JAFFE und NEWTON, 1970) bzw.
- durch das Fehlen des N-terminalen Pyroglutamylrestes, der sonst das Molekül vor dem Einfluß der Aminopeptidasen

schützt (THOMPSON, REEDER, DAVIDSON, CHARTERS, BRÜCKNER, LEMMI und MILLER, 1969).

Der Versuch, durch radioaktiv markiertes Gastrin Aufschluß über die am Stoffwechsel des Hormons beteiligten Organe zu erhalten, führte zu interessanten Ergebnissen (JAFJE und NEWTON, 1969; NEWTON und JAFJE, 1971). Selbst wenn man in Betracht zieht, daß der Nachweis markierter Substanzen in einem Organ keine genaue Aussage über den Ort des Ab- bzw. Umbaues oder über die Art und Größe des Moleküls zuläßt, erscheint es doch bemerkenswert, daß sich bei Hunden drei Stunden nach Versuchsbeginn kaum aktives Material in der Leber, dafür aber vor allem in der Niere nachweisen ließ. Untersuchungen mit Rattennierenhomogenat (PLEWE, 1973) zeigten eine etwa gleichstarke Inaktivierungsfähigkeit wie Rattenleberhomogenat (LÜDCKE, 1972), so daß eine Beteiligung der Niere am Abbau des Gastrins diskutiert wird. Dagegen ist die katabole Wirkung von Humanserum auf Gastrin so gering, daß es in Betracht der niedrigen Halbwertszeit des im Blut kreisenden Hormons kaum an dessen Abbau beteiligt sein dürfte (LINTHE, 1973).

2.5. Das Zollinger-Ellison-Syndrom

Soweit bis heute bekannt ist, kann von den gastro-intestinalen Hormonen lediglich das Gastrin Überproduktionssymptome hervorrufen, die unter dem Namen Zollinger-Ellison-Syndrom zusammengefaßt werden. Man versteht darunter die Koinzidenz eines oder mehrerer Inselzelltumoren des Pankreas und therapieresistente Ulzerationen im Bereich des Magens oder des Duodenums mit teils atypischer Lokalisation. Daß dieses Zusammentreffen nicht zufällig ist, wurde erstmals durch ZOLLINGER und ELLISON (1955) erkannt, denen es gelang, durch Beseitigung der Adenome eine Heilung der Ulkuskrankheit einzuleiten.

Nach heutiger Sicht gehören Magen und Bauchspeicheldrüse zu einer Verdauungseinheit, in der Magensaftsekretion und Bauchspeicheldrüse aufeinander abgestimmt sind (BECKER, 1965; 1967; 1970). Normalerweise nimmt die geringfügige Gastrinproduktion im insulären Gangorgan des Pankreas keinen nennenswerten Einfluß auf dieses System; dagegen muß die beim Zollinger-Ellison-Syndrom zu beobachtende Hypergastrinämie als Ausdruck einer pathologischen Entgleisung der physiologischen Gastrinbildung im Pankreas gewertet werden. Das durch Inselzelladenome im Übermaß gebildete Gastrin regt die Salzsäureproduktion der Fundusdrüsen so stark an, daß Ulzerationen auftreten. Die häufig durchgeführte Magenresektion nach Billroth I oder II entfernt lediglich die gastrale Bildungsstätte des Hormons, beläßt aber weiterhin die salzsäureproduzierenden Anteile des Magens, so daß - bedingt durch die pankreatische Gastrinbildung - keine Heilung erwartet werden kann. Als folgerichtig erwies sich also die Entfernung des Adenoms; es tritt aber häufig nicht nur einzeln, sondern vermehrt auf, so daß die totale Beseitigung Schwierigkeiten bereitet. Die Durchführung einer Gastrektomie würde zwar die Salzsäureproduktionsstätte beseitigen, doch die zur malignen Entartung neigenden Adenome im Körper belassen. Die Therapie der Wahl bei Zollinger-Ellison-Syndrom besteht daher in einer totalen

Entfernung des Magens und einer Beseitigung der sichtbaren Adenome bzw. einer Teilresektion der Bauchspeicheldrüse.

Zur Verifizierung des Zollinger-Ellison-Syndroms gehört neben der verhältnismäßig unproblematischen Ulcusdiagnose der wesentlich schwierigere Nachweis des Inselzelladenoms im Pankreas, als dessen wichtigster Indikator die signifikante Steigerung der Gastrinkonzentration im Serum angesehen werden muß. Bis zur Einführung radioimmunologischer Untersuchungsmethoden in die Gastrinforschung durch McGUIGAN (1968) gab es jedoch kein Verfahren, das die quantitative Bestimmung des Hormons im Serum erlaubte. Daher war die Beobachtung, daß der Urin von Zollinger-Ellison-Patienten einen Faktor enthielt, der - ähnlich dem Gastrin - die Magensaftsekretion der Ratte zu stimulieren vermochte (BONFILS, BADER, DUBRASQUET und LAMBLING, 1963) nicht nur von klinisch-diagnostischem Wert, sondern auch von pathophysiologischem Interesse und führte zur Entwicklung eines Verfahrens, das die Reindarstellung dieses Faktors ermöglichte (BONFILS, VATIER und ACCARY, 1970).

Im Jahre 1958 veröffentlichten BONFILS, ROSSI und LAMBLING eine Operationsmethode, die es gestattete, mit Hilfe einer transduodeno-gastrischen Fistel die salzsäurestimulierende Wirkung von Testsubstanzen auf die Magenschleimhaut der Ratte zu beurteilen (Methodische Einzelheiten s. unter 3.5.). Die in der Folgezeit mit Urin durchgeführten Untersuchungen, von den Autoren als P.S.U.-Test (Pouvoir Sécrétagogue des Urins) bezeichnet, werden ergänzt durch Versuche nach dem von GHOSH und SCHILD (1958) angegebenen und von LAI (1964) modifizierten Operationsverfahren, bei dem der Magen einer, für die Dauer der Operation narkotisierten Ratte vor und nach Gabe des Testmaterials (Serum oder Urin) perfundiert wird. Dadurch ist eine Objektivierung der Ergebnisse möglich. Nach statistischer Auswertung einer Vielzahl von Tierversuchen lassen sich folgende allgemeine Kriterien ableiten:

1. Urin gesunder Personen zeigt nach 12-stündiger Nahrungskarenz keine Stimulationsfähigkeit; postprandial ist sie dagegen nachweisbar.

2. Nachträgliche Veränderungen des pH-Wertes der Testsubstanz nehmen keinen Einfluß auf das ursprüngliche Ergebnis der Versuche.
3. Gabe von Medikamenten mit überwiegend nephrogener Elimination beeinflussen den P.S.U.-Test und müssen vermieden werden.
4. Um eine maximale Stimulation zu erreichen, müssen Volumina zwischen 0,1 und 1,0 ml getestet werden. Man schließt dadurch gleichzeitig eine Hemmung der Magensaftsekretion durch zu hohe Konzentration der Testsubstanz aus.
5. Die Interpretation der Ergebnisse im Sinne einer Dosis-Wirkung-Beziehung ist wegen der Anwesenheit hemmender Substanzen unterschiedlicher Konzentration im Urin nicht möglich.

Für die klinische Diagnostik konnten folgende Ergebnisse abgeleitet werden:

1. Ein negativer P.S.U.-Test schließt die Diagnose "Zollinger-Ellison-Syndrom" in jedem Falle aus.
2. Positive Ergebnisse erhält man nicht nur bei Anwesenheit eines oder mehrerer Inselzelladenome, sondern bereits bei beginnender Hyperplasie der A₁-Zellen des Pankreas. Eine Korrelation zwischen Testergebnissen und klinischem Befund ist nicht möglich.
3. Die totale Ausräumung tumoröser Prozesse des Pankreas nach chirurgischem Eingriff wird durch das Verschwinden positiver P.S.U.-Tests angezeigt.
4. Positive P.S.U.-Tests sind auch in einigen Fällen von Pylorusstenose, bei alkoholischer Lebercirrhose, nach porto-cavaler Anastomose und bei Pankreatitis beobachtet worden.

Nach neueren Veröffentlichungen von BONFILS, VATIER und ACCARY (1970) ergeben Untersuchungen des Serums von Patienten mit positivem P.S.U.-Test, daß nach Papierelektrophorese der salzsäurestimulierende Faktor ausnahmslos in der Fraktion der Serumalbumine lokalisiert ist. Mit ¹²⁵J und ¹³¹J markiertes Gastrin konnte ebenfalls vor und im Serumalbumin nachgewiesen werden (ACCARY, SIZONENKO, DUBRASQUET und BONFILS, 1971).

Versuche mit Zollinger-Ellison-Patientenurin ermöglichen nach Chromatographie auf Sephadex G 25 die Trennung von zwei konstanten Fraktionen G und V, von denen in jedem Fall nur eine aktiv ist. Aminosäureanalysen ergeben folgende Charakterisierungen:

Die V-Fraktion besteht aus etwa 16 bis 24 Aminosäuren und ist durch ihren hohen Gehalt an Serin und Glycin, die Anwesenheit von Threonin und Valin sowie das Fehlen von Methionin, Tyrosin und Phenylalanin gekennzeichnet. Sie scheint keinen unmittelbaren Bezug zum Gastrin zu besitzen.

Die G-Fraktion zeigt dagegen ein hohes Maß an Übereinstimmung mit dem von GREGORY et al. bestimmten Molekül. Auffällig ist jedoch der Nachweis von Serin und Lysin, die in jenem Molekül fehlen.

Die letztgenannten Ergebnisse waren bestimmend für die Fragestellungen dieser Arbeit. Bei der großen Ähnlichkeit zwischen dem Gastrinmolekül und der G-Fraktion sollte untersucht werden, ob

1. die Rückgewinnung von Gastrin, das dem Urin einer Normalperson hinzugegeben worden war, prinzipiell möglich ist und
2. die Isolierung der salzsäurestimulierenden Fraktion eines Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom versucht werden.

3. Methodik

3.1. Allgemeines

Das für die Untersuchungen erforderliche Gastrin wurde aus der Tunica mucosa des Antrumanteils von Schweinmägen extrahiert. Grundsätzlich erfolgte die Reindarstellung des Gastrins nach der von GREGORY und TRACY (1964) beschriebenen Methode, sowie den später veröffentlichten Modifikationen im Zusammenhang mit der Extraktion von Gastrin I und Gastrin II aus menschlichen Mägen und Zollinger-Ellison-Tumoren (GREGORY, TRACY und GROSSMANN 1966; GREGORY, TRACY, GROSSMANN und AGARWAL 1969). Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in der Anlagerung des in wäßriger Extraktionsphase vorhandenen Gastrins an Anionenaustauscher. Das vom Austauscher eluierte, stark negativ geladene Peptid wird dann in eine Isopropanolphase überführt und aus ihr mit Hilfe von Äther in ein kleines Volumen wäßriger Phase verdrängt. Nach Fällung und erneuter Lösung in Aqua dest. erfolgt die chromatographische Trennung zunächst der Proteinfraction und schließlich die Reindarstellung von Gastrin I und Gastrin II.

Als Anionenaustauscher fand die Diäthylaminoäthyl-Zellulose (DEAE-Zellulose, WHATMAN DE 22, Nr. 24011) Verwendung, die folgendermaßen vorbehandelt wurde:

75 g wurden in ca. 2.500 ml Aqua dest. zum Quellen gebracht, darin 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und dann durch ein Nylontuch filtriert und ausgepreßt. Wiederholung dieses Vorganges mit ca. 2.500 ml 0,5 n HCl. Nach Abpressen der HCl mehrmaliges Waschen der Zellulose in Aqua dest., bis der pH-Wert des Wassers etwa 4,0 betrug (Prüfung mit Indikatorpapier). Dann wurde die Zellulose 30 Minuten in ca. 2.500 ml 0,5 n NaOH gegeben und danach solange mit Aqua dest. gewaschen, bis der pH-Wert des zum Waschen benutzten Wassers 7,0 betrug. Die Aufbewahrung der Zellulose erfolgte in einer mit Aqua dest. gefüllten, verschließbaren Flasche bei Raumtemperatur, dem zur Vermeidung bakteriellen Wachstums eine Spatelspitze Natriumazid zugegeben worden war. Erfahrungsgemäß konnte die Zellulose

je nach Verfettungszustand bis zu dreimal benutzt werden. Gebrauchte Zellulose wurde zunächst 30 Minuten in 2.500 ml 0,5 n NaOH gegeben, mit Aqua dest. gewaschen und danach wie oben beschrieben behandelt.

3.2. Extraktion des Gastrins aus Schweinemägen

Die zur Reindarstellung von Gastrin I und Gastrin II erforderliche Zeit teilt den gesamten Vorgang der Extraktion zwangsläufig in einzelne Teilschritte. Da es anfänglich notwendig war, den Rohextrakt der verschiedenen Reinheitsstufen auf seine Aktivität hin zu untersuchen und die dabei gewonnenen Ergebnisse später ausführlich behandelt werden, erscheint es zweckmäßig, bereits der folgenden Besprechung jene Gliederung des Arbeitsverfahrens voranzustellen, die auch in Kapitel 4 Verwendung findet, um so die Orientierung zu erleichtern:

1. Gewinnung des Gastrins aus Schweineantra
2. Anlagerung an DEAE-Zellulose
3. Eluierung der Zellulose und Fällung des Eluats
4. Isopropanolextraktion
5. Ätherextraktion
6. Chromatographische Trennung

3.2.1. Gewinnung des Gastrins aus Schweineantra

Jeweils 100 bis 170 Schweineantra wurden gründlich mit Wasser gespült, von Fett befreit und in einem Fleischwolf zerkleinert. Der Gewebsbrei wurde in 60 l Wasser unter kräftigem Rühren 30 Minuten gekocht und danach auf 18⁰ C abgekühlt. Dafür wurde eine wandnah in den Kessel einsetzbare Kühlschlange aus Kupferrohr ($\varnothing = 0,8$ cm) von 20 m Länge benutzt, die mit kaltem Leitungswasser durchspült wurde. Um die Effektivität der Kühlung zu erhöhen, lief auch bei diesem Vorgang der Rührer. Die Ge-

schwindigkeit war aber diesmal wesentlich gedrosselt, so daß die Möglichkeit bestand, eventuell auf der Extraktionsflüssigkeit schwimmendes Fett abschöpfen zu können. Das war notwendig, um einer zu raschen Verfettung der DEAE-Zellulose vorzubeugen. An den Kühlvorgang schloß sich die Überführung des Extraktes durch ein Filtersystem an, das aus mehrschichtigen Mullagen, einer etwa 1 cm dicken Schicht Zellwolle und einem feinmaschigen Nylontuch bestand. Nach Passage der Filter floß die Flüssigkeit in eine 120 l fassende Wanne und wurde mit 5 n NaOH auf pH 8,5 eingestellt.

3.2.2. Anlagerung an DEAE-Zellulose

In dem sich anschließenden Arbeitsvorgang erfolgt die Anlagerung des in der filtrierte Extraktionsflüssigkeit befindlichen Gastrins an den Anionenaustauscher. Dazu wurden 75 g DEAE-Zellulose nach Vorbehandlung in der unter 3.1. beschriebenen Weise unter pH-Wert-Kontrolle (pH 8,5) in die Flüssigkeit gegeben und 3 Stunden kräftig gerührt. Nach Ablauf dieser Zeit konnte die Zellulose in einem Filter aus Nylontuch aufgefangen und mit etwas Leitungswasser ausgewaschen werden. Zwischenzeitlich durchgeführte Extraktionsversuche mit vorgequollener mikrogranulärer Zellulose (WHATMAN, DE 52) wurden wieder eingestellt, da die feinen Zellulosepartikel das Nylonfilter rasch verstopften und so den Filtrationsvorgang erheblich verlängerten.

3.2.3. Eluierung der Zellulose und Fällung des Eluats

Um das an die Zellulose gebundene Gastrin wieder in Lösung zu bringen, wurde in folgender Weise verfahren: die DEAE-Zellulose wurde mit 1.500 ml einer 0,2 n NaOH versetzt, auf einer Schüttelmaschine kräftig durchmischt (30 Minuten) und anschließend in einem Büchnertrichter filtriert. Zur Fällung der Proteine wurde die Lösung mit 5 n HCl auf einen pH-Wert von 3,9 titriert.

Um eine ausreichende Sedimentierung des Proteinniederschlags zu ermöglichen, schloß sich über Nacht die Lagerung bei 2° C in einer Kühltruhe an. Normalerweise zeigte sich am nächsten Morgen eine deutliche Trennung zwischen dem weißen Proteinsediment und dem klaren gelblichen Überstand. War dieser dagegen trüb, wurde der pH-Wert nicht optimal eingestellt. Eine Korrektur und nochmalige Sedimentierung waren notwendig, da trüber Überstand im Rattenversuch eine säurestimulierende Wirkung zeigte, die sich bei klarem Überstand nicht nachweisen ließ. Auf die in der Arbeit von GREGORY und TRACY (1964) beschriebene Anlagerung des Niederschlages an Kieselgur konnte daher verzichtet werden. Mit Hilfe eines dünnen Plastikschauches wurde dann der klare Überstand im Heberverfahren abgelassen und zur vollständigen Trennung von Proteinniederschlag und Überstand das noch im Erlenmeyerkolben befindliche Sediment in einer Kühlzentrifuge mit 3.000 U/min bei 2° C zentrifugiert. Nachdem der Überstand dekantiert worden war, erfolgte das Einfrieren des Proteinsediments bei -18° C in den Zentrifugenröhrchen bis zur weiteren Verarbeitung.

3.2.4. Isopropanolextraktion

Nachdem der Proteinniederschlag von 600 bis 700 Schweineantra gesammelt worden war, erfolgte dessen Auflösung unter kräftigem Rühren in 600 ml Aqua dest. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 18 n Ammoniak auf 10,0 eingestellt, in einem Eisbad 300 g Dikaliumhydrogenphosphat sowie 480 ml peroxydfreier Isopropylalkohol hinzugefügt und 40 Minuten kräftig gerührt. Die anschließende Zentrifugierung mit 3.000 U/min bei 2° C brachte eine deutlich sichtbare Trennung in eine obere Isopropanolphase und eine darunterliegende wäßrige Phase. Die Isopropanolphase wurde vorsichtig abgesaugt und gesammelt, die untere wäßrige Phase mit einem Gemisch aus 200 ml Aqua dest., 4 ml 18 n Ammoniak, 100 g Dikaliumhydrogenphosphat und 148 ml Isopropylalkohol versetzt und erneut 30 Minuten gerührt. Durch Zentrifugierung konnte die neu erhaltene Isopropanolphase der

ersten hinzugefügt werden. Bei diesen Schritten sollte folgendes beachtet werden: Isopropylalkohol ist vollständig in Wasser löslich. Salzionen verdrängen jedoch den Alkohol aus seiner Lösung mit Wasser. Dabei geht das Gastrin aus der wäßrigen in die Isopropanolphase über. Es ist daher notwendig, auf die vollständige Auflösung des zugefügten Dikaliumhydrogenphosphats zu achten und durch ausreichendes Zentrifugieren eine exakte Trennung der beiden Phasen zu erreichen.

3.2.5. Ätherextraktion

In dem sich anschließenden Arbeitsgang erfolgte die Überführung des Gastrins aus der Isopropanolphase wiederum in eine wäßrige Phase mit Hilfe von Äther. Da dieser Vorgang dreimal wiederholt werden muß, waren die drei Kolben mit Ausflußhahn kaskadenartig miteinander verbunden worden. In dem oberen und größten der drei Kolben wurde die Isopropanolphase und dazu das dreifache Volumen von peroxydfreiem Diäthyläther sowie 50 ml Aqua dest. gegeben und 10 Minuten gerührt. Danach wurde die Trennung der Isopropanol-Äther-Phase von der wäßrigen Phase abgewartet, die unten im Gefäß befindliche wäßrige Phase in das zweite Gefäß abgeleitet und hier erneut mit dem dreifachen Volumen Äther in der eben beschriebenen Weise extrahiert. Nachdem dieser Vorgang ein drittes Mal wiederholt worden war, konnte die wäßrige Phase in einem Vorratsgefäß aufgefangen werden. Um gegebenenfalls in der Isopropanol-Äther-Phase verbliebenes Gastrin noch extrahieren zu können, wurden in den ersten der drei Kolben noch einmal 50 ml Aqua dest. gefüllt und wie oben beschrieben verfahren. Das Hinzufügen von Äther in die drei Kolben erübrigte sich dabei, da dieser ja von dem ersten Durchlauf noch vorhanden war. Schließlich konnte auch diese wäßrige Phase der ersten hinzugefügt werden. Um eine möglichst vollständige Trennung der wäßrigen Phase vom Äther zu erreichen, schlossen sich noch zwei Arbeitsgänge an: einmal die Zentrifugierung der so gewonnenen 100 ml Flüssigkeit in der Kühlzentrifuge bei 2° C mit 3.000 U/min für 20 Minuten und zum anderen die Verdunstung des restlichen Äthers unter leichtem Vakuum innerhalb von etwa 12 Stunden. Dabei sollte es vermieden werden,

daß der Luftstrom durch die Flüssigkeit geleitet wird, da die nach einiger Zeit einsetzende Schaumbildung zu Substanzverlust führt.

Das in den Arbeiten von GREGORY und seinen Mitarbeitern beschriebene Zentrifugieren des Isopropanol-Äther-Wasser-Gemisches wurde nicht nachvollzogen; an seine Stelle trat das Absetzen der Phasen in den einzelnen Kolben. Der erhebliche zeitliche Gewinn, bedingt durch die Vermeidung des langwierigen Zentrifugierens, wurde dem geringen Substanzverlust infolge der unvollständigen Phasentrennung vorgezogen.

Nach Evaporation des Äthers wurde die wäßrige Phase in ein großes Zentrifugenglas gegeben und der pH-Wert der Lösung mit Eisessig auf 4,0 eingestellt. Dabei trat ein flockiger Niederschlag auf, der in der Kühlzentrifuge bei 3.000 U/min innerhalb von 30 Minuten sedimentiert wurde. Nach Dekantierung des Überstandes erfolgte die Lösung des Niederschlages in 5 ml Aqua dest. unter Zugabe einiger Tropfen Ammoniak.

3.2.6. Chromatographische Trennung

Die sich anschließende chromatographische Trennung der aktiven Lösung gliederte sich in zwei Teilschritte: die Isolierung der Gastrinfraktion aus dem Gemisch von Peptiden und Proteinen und schließlich die Aufspaltung des Gastrins in seine beiden Komponenten Gastrin I und Gastrin II.

Zunächst wurde die Flüssigkeit auf eine in 0,04 Mol Ammoniumbikarbonat gepackte Säule aus Sephadex G 50 (2,5 x 90 cm, PHARMACIA) gegeben, die mit einer 0,04 molaren NH_4HCO_3 -Lösung equilibriert war. Zur Verhinderung bakteriellen Wachstums erfolgte der Zusatz von 0,02 % Natriumazid. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 6 ml/h. Die Fraktionen wurden zu 5 ml gesammelt und anschließend bei 280 nm in 0,5 cm Quarzküvetten mit einem Zeiss-Spektralphotometer auf ihren Eiweißgehalt untersucht. Dabei zeigten die Chromatogramme einen typischen, jederzeit reproduzierbaren Verlauf, so daß auf die anfänglich

durchgeführten Tierversuche zur Bestimmung der aktiven Fraktion später verzichtet werden konnte. Diese wurde lediglich auf Grund ihrer Lokalisation im Chromatogramm gesammelt und lyophilisiert. Um eine möglichst vollständige Entfernung des im Lyophilisat vorhandenen Ammoniumbicarbonats zu erreichen, schloß sich eine erneute Auflösung der Trockensubstanz in 30 ml Aqua tridest. mit nachfolgender Gefriertrocknung an. Dieser Vorgang wurde zwei- bis dreimal wiederholt.

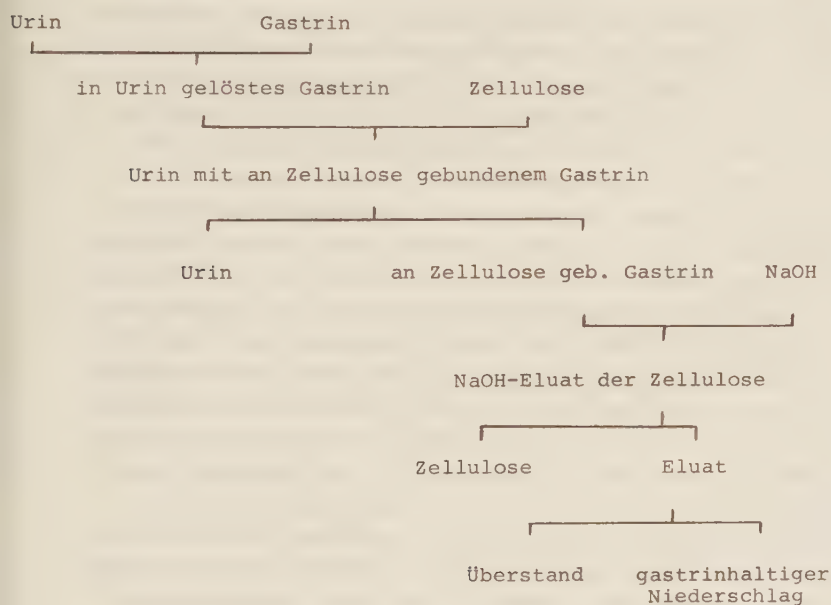
Die endgültige Aufspaltung der Fraktion in Gastrin I und Gastrin II wurde durch eine erneute säulenchromatographische Trennung möglich. Dazu fand eine in 0,04 Mol Ammoniumbicarbonat geschichtete Säule aus AE-Zellulose (1,0 x 25 cm, WHATMAN) Verwendung. Die lyophilisierte Gastrinfraktion wurde in 5 ml 0,02 Mol Ammoniumcarbonat gelöst und auf die Säule gegeben. Eluiert wurde sie mit NH_4HCO_3 -Lösung steigender Konzentration. Dazu wurden etwa 180 ml einer 0,02 Mol Lösung in ein luftdicht verschlossenes Vorratsgefäß mit elektrischem Rührer gegeben, an das ein zweites Gefäß mit etwa 300 ml 0,2 Mol NH_4HCO_3 -Lösung angeschlossen war. Der durch die Schlauchpumpe (Durchflußgeschwindigkeit 6 ml/h) erzeugte Unterdruck bewirkte ein Ansaugen der höher konzentrierten Lösung und damit einen Anstieg der Konzentration im Vorratsgefäß. Die weitere Verarbeitung entsprach dem oben beschriebenen Verfahren. Die photometrische Bestimmung führte zur Aufstellung eines Chromatogramms, dessen zweigipfliger Verlauf den beiden Gastrinfraktionen entsprach. Sie wurden wiederum gesammelt, zwei- bis dreimal lyophilisiert und in einer Kühltruhe bei -80°C gelagert.

3.3. Rückgewinnung von dem Urin zugegebenen Gastrin

Der für diese Untersuchungen verwendete Rohextrakt von Gastrin war bis zur Stufe der Isopropanol-Äther-Extraktion gereinigt worden. Nach der Sedimentierung der Proteine in der wäßrigen Phase mit Eisessig bei einem pH-Wert von 4,0 wurde das aktive Material bei pH 7,0 wieder gelöst und lyophilisiert.

Für Kontrolluntersuchungen der Säurestimulation im Tierversuch wurde die Darstellung bis zur Trennung von Gastrin I und Gastrin II auf AE-Zellulose durchgeführt.

Zur Verdeutlichung der einzelnen Teilschritte dient die schematische Darstellung der Tab. 2.



Tab. 2: Schematische Darstellung der Rückgewinnung des dem Urin exogen hinzugefügten Gastrins

Von 250 ml frischem Urin wurden 20 ml für Kontrollversuche mit 0,2 n NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und im Rattenversuch getestet. Die rechtlichen 230 ml wurden mit 15,39 mg Rohextrakt, der Ausbeute aus 150 Schweineantra, versetzt. Bei einem Gastrinanteil von annähernd 30 % auf dieser Reinheitsstufe, entsprach das einer Gastrinkonzentration von 20 bis 25 $\mu\text{g/ml}$ Urin. Davon wurden 50 ml wiederum auf pH 7,0 eingestellt und sofort im Rattenversuch getestet, weitere 50 ml zwar ebenfalls auf einen pH-Wert von 7,0 gebracht, dann allerdings für 5 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und danach eingefroren. Dieser Versuch sollte zeigen, ob der Urin bei längerem Stehen in der Wärme in irgendeiner Weise Einfluß auf die Wirkung des Gastrins zu nehmen vermag. 50 ml des mit Gastrinextrakt versetzten Urins wurden mit 5 n NaOH auf pH 8,0 eingestellt, wobei eine leichte Trübung zu beobachten war. Dazu wurden 50 g vorgequollene mikrogranuläre DEAE-Zellulose gegeben und die Lösung über 3 Stunden im Kühlraum bei 4° C gerührt. Die Trennung vom Urin und Zellulose mit einem Büchnertrichter und das Auswaschen der Zellulose mit Aqua dest. schlossen sich an. Um eine eventuell vorhandene Restaktivität, des filtrierte Urins im Rattenversuch nachweisen zu können, erfolgte die Titration auf den Neutralpunkt, der sich die Gefriertrocknung anschloß. Sie wurde notwendig, um das durch das Waschen der Zellulose auf etwa 90 ml vergrößerte Volumen wieder auf den Ausgangswert von 50 ml einzuengen. Die Weiterverarbeitung der Zellulose geschah nach dem gleichen Prinzip wie bei der Extraktion des Gastrins aus Schweinemägen: sie wurde 30 Minuten lang mit 100 ml 0,2 n NaOH gerührt und das Eluat der DEAE-Zellulose nach Filtration in einem Büchnertrichter auf einen pH-Wert von 3,9 gebracht. Anschließendes Zentrifugieren mit 3.000 U/min bei 2° C über 20 Minuten ermöglichte eine vollständige Trennung von ausgeflocktem Niederschlag und Überstand. Das Sediment wurde in 50 ml Aqua tridest. gelöst und im Rattenversuch getestet.

Um eine möglichst vollständige Darstellung des exogen zugeführten Gastrins aus dem Urin zu gewährleisten, wurde die zuletzt beschriebene experimentelle Anordnung dahingehend erweitert, daß die Extraktion viermal mit frischer Zellulose wieder-

holt und die zum Rühren benötigte Zeit verdoppelt wurde. Ferner fand diesmal die für diese Versuche besser geeignete faserige Form der DEAE-Zellulose Verwendung. Hiervon wurden 9,3 g (Trockengewicht) in der unter 3.1. beschriebenen Weise vorbehandelt und in vier gleiche Teile geteilt. 72 ml des noch verbliebenen mit Gastrinextrakt angereicherten Urins wurden im Kühlraum mit 5 n NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und viermal hintereinander mit je einem Teil der DEAE-Zellulose 90 Minuten lang gerührt. Die einzelnen DEAE-Zellulosechargen wurden gesammelt, mit 300 ml 0,2 n NaOH 30 Minuten lang eluiert und das Eluat auf einen pH von 7,0 eingestellt. Auf die Fällung des Gastrins bei pH 3,9 und die anschließende Sedimentierung in der Kühlzentrifuge wurde diesmal verzichtet, um das zeitlich aufwendige Zentrifugieren der 300 ml Eluat zu umgehen und Verluste des ohnehin geringen Niederschlags beim Überführen aus den einzelnen Zentrifugengläsern zu vermeiden. Statt dessen wurde das auf pH 7,0 eingestellte Eluat lyophilisiert und anschließend unter pH-Wertkontrolle in 70 ml Aqua tridest. gelöst. Die Trennung im Tierversuch schloß sich an. Der filtrierte Urin wurde ebenfalls auf pH 7,0 gebracht und im Tierversuch auf Restaktivität überprüft. Bei später durchgeführten Versuchen wurde die zuletzt beschriebene Versuchsanordnung, die zwar bessere Ergebnisse erbrachte, dafür aber einen erheblichen zeitlichen Aufwand erforderte, dahingehend modifiziert, daß 5 g DEAE-Zellulose (Trockengewicht) nach entsprechender Vorbehandlung auf eine Chromatographiesäule (1,5 x 35 cm) aufgebracht und mit 50 ml gastrinhaltigem Urin (pH 8,0) durchspült wurden. Die Durchflußgeschwindigkeit war so eingestellt, daß die 50 ml Urin die Säule nach vier Stunden passiert hatten. Das in Tierversuchen getestete Filtrat wies keine nennenswerte Restaktivität mehr auf. Die DEAE-Zellulose wurde mit 60 ml 0,2 n NaOH 30 Minuten lang gerührt, filtriert und das Filtrat nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 lyophilisiert. Die sich anschließende Säulenchromatographie erfolgte auf Sephadex G 50 (1,5 x 90 cm). Dazu wurde das Lyophilisat in 5 ml 0,04 Mol Ammoniumbicarbonat gelöst, auf die Säule aufgebracht und bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 ml/h mit 0,04 Mol NH_4HCO_3 -Lösung durchspült. Die

photometrische Bestimmung der in Fraktionskammern gesammelten Elutionsflüssigkeit schloß sich an. Das Chromatogramm zeigte drei Peaks. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in jeweils 10 ml Aqua tridest. gelöst, wobei 5 ml wiederum gefriergetrocknet, die restlichen 5 ml für Tierversuche mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 2 verdünnt wurden. Die Ergebnisse wiesen die erste Fraktion als eindeutig gastrinhaltig aus. Schließlich wurde versucht, durch Säulenchromatographie mit AE-Zellulose eine Trennung der ersten Fraktion in Gastrin I und Gastrin II zu erreichen und in der unter 3.2.6. beschriebenen Weise verfahren.

3.4. Verarbeitung eines fraglichen Zollinger-Ellison-Urins

Über mehrere Wochen war der Urin eines Patienten, bei dem nach klinischen Befunden ein Zollinger-Ellison-Syndrom in Erwägung gezogen werden mußte, gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank bei -18°C eingefroren worden. Die Testversuche mit Ratten hatten zwar keine eindeutige Stimulierung der Magensaftsekretion ergeben, dennoch wurde der Urin in folgender Weise verarbeitet:

Nach dem langsamen Auftauen wurde er filtriert und das Volumen bestimmt. Es betrug 6.800 ml. In einem Kühlraum (3°C) wurde der pH-Wert mit 5 n NaOH auf 8,0 eingestellt und unter pH-Wertkontrolle 120 g DEAE-Zellulose (Trockengewicht), die in der unter 3.1. beschriebenen Weise vorbehandelt worden war, hinzugegeben. Nach zweistündigem Rühren schloß sich die Filtration der Zellulose in einem Büchnertrichter an. Während die Verarbeitung des filtrierten Urins in der eben beschriebenen Weise noch zweimal wiederholt wurde, konnten bereits die ersten 120 g Zellulose in etwa 2.500 ml 0,2 n NaOH 45 Minuten lang gerührt und danach in einem Büchnertrichter filtriert werden. Das so gewonnene Eluat wurde gesammelt und die aus den beiden folgenden Extraktionsschritten gewonnenen Volumina hinzugefügt. Schließlich waren die 6.800 ml Urin des Patienten mit insgesamt 360 g DEAE-Zellulose 6 Stunden lang gerührt worden.

Um das Eluat weiter verarbeiten zu können, mußte zunächst dessen Volumen eingeengt werden. Nachdem der pH-Wert mit 5 n HCl auf 7,0 eingestellt worden war, erfolgte das Gefrier-trocknen in Fraktionen von jeweils 200 ml. Das anfänglich durchgeführte Auflösen des Lyophilisats in dem neu zu bearbeitenden Volumen hat sich nicht bewährt, da die mit steigender NaCl-Konzentration eintretende Gefrierpunktserniedrigung der Lösung das Lyophilisieren immer mehr erschwerte. So war es zwischenzeitlich notwendig, das auf etwa 3.000 ml verringerte Volumen mit 250 g Sephadex G 10 zu versetzen und 3 Stunden lang zu rühren, um durch die partielle Bindung von Kochsalz die Weiterverarbeitung des Eluats zu ermöglichen. Dar-

aufhin wurde das Lyophilisat jedesmal in ein Sammelgefäß gefüllt und bei -18°C aufbewahrt. Nach vollständiger Gefrier-trocknung des Urins schloß sich dessen Auflösung in 100 ml Aqua tridest. und eine erneute Behandlung mit 50 g Sephadex G 10 an, um möglichst viel NaCl vor der weiteren Behandlung zu eliminieren. Hierzu wurde der Urin 90 Minuten lang im Kühlraum gerührt und danach in einer Kühlzentrifuge 10 Minuten lang bei 3.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und anschließend lyophilisiert. Danach wurde das Lyophilisat in 4 ml 0,04 Mol Ammoniumbicarbonat gelöst und auf eine Säule mit Sephadex G 50 (1,5 x 35 cm) gegeben. Als Elutionsflüssigkeit fand wiederum 0,04 Mol Ammoniumbicarbonat-Lösung Verwendung, die mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 ml/h über drei Tage in einem Fraktionssammler aufgefangen wurde. Photometrische Bestimmungen ergaben lediglich einen außerordentlich hohen Gipfel mit vorgelagerter kleiner Schulter, der gesammelt und lyophilisiert wurde. Die Testung im Tierversuch erfolgte in Form einer Verdünnungsreihe, zu der das Lyophilisat zunächst in 20 ml Aqua tridest. gelöst und dann

10 Tieren je 1,0 ml dieser Lösung,

10 Tieren je 0,5 ml Lösung und 0,5 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung und

10 Tieren je 0,25 ml Lösung und 0,75 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung

s.c. injiziert wurden.

3.5. Tierversuche zur Überprüfung der Stimulationsfähigkeit von Gastrinextrakten

Eindeutiger Indikator für die Anwesenheit von Gastrin im Tierversuch ist die signifikante Stimulierung der Magensaftsekretion während einer Testperiode gegenüber der Leersekretion. Anwendung fand die von BONFILS, ROSSI und LAMBLING 1958 beschriebene Methode an Ratten mit transduodeno-gastrischer Fistel.

Männliche Whistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 350 g wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn in einem Käfig mit Gitterboden zur Vermeidung der Koprophagie gehalten und mit einer Glukose-Kochsalz-Lösung (8 g NaCl und 150 g Glucose/1000 ml Wasser) ernährt. Das Anlegen der Fistel erfolgte während einer Operation in Äthernarkose, wobei ein 8 cm langer Polyäthylenkatheter ($\varnothing = 0,2$ mm) von einer Incisur etwa 0,5 cm unterhalb des Sphincter pylori 1 cm durch das Duodenum in den Magen vorgeschoben und fixiert wurde. Nach beendeter Operation konnte so der Magensaft über zweimal drei Stunden gesammelt werden. Der Anteil an freier und gebundener Salzsäure im Magensaft des unbeeinflussten Tieres während der ersten Sammelperiode stellte als Leersekretion den Vergleichswert für die Veränderungen nach subcutaner Injektion des zu untersuchenden Materials während der zweiten drei Stunden dar. Registriert wurden dabei

1. das Volumen des sezernierten Magensaftes,
 2. der aktuelle pH-Wert der beiden Proben,
 3. der Anteil an freier (pH = 3,5) und gebundener (pH = 7,0) HCl.
- Die Titration der Magensäfte zur Bestimmung der unter Nr. 3 angeführten Werte erfolgte mit 0,15 n NaOH.

Da es bei diesen Tierversuchen in der Hauptsache um den Nachweis von Gastrin in Testsubstanzen ging, also entweder eine maximale Stimulation oder keine signifikante Steigerung der Magensaftsekretion gegenüber der Basalsekretion erwartet wurde, spielte die bei Tierversuchen unvermeidbare Streubreite der gewonnenen Ergebnisse keine so entscheidende Rolle. Sollten dagegen genauere Angaben gemacht werden, war eine Auswahl der Werte notwendig. Über die Erarbeitung der Selektionskriterien s. SEELIG (1972). Die korrigierten Daten sind mit den Buchstaben (KD) gekennzeichnet.

4. E r g e b n i s s e

4.1. Gastrinextraktion aus Schweinemägen

Um nach Fertigstellung der Extraktionsanlage eine möglichst genaue Kontrolle über die Effektivität der einzelnen, bei der Gastrindarstellung zu durchlaufenden Arbeitsgänge zu erhalten und gleichzeitig die durch einen technischen Fehler bedingte weitere Verarbeitung von biologisch inaktivem Material zu vermeiden, war es anfänglich notwendig, den Gastrinrohextrakt progressiver Reinheitsstufe immer wieder auf seine säurestimulierende Wirkung hin zu untersuchen. Wie bereits unter 3.2. erwähnt, bedingte der zeitliche Aufwand der Reindarstellung des Hormons eine Unterteilung des Extraktionsvorganges in sechs Teilschritte, an die sich jeweils ein Rattenversuch anschloß.

Zu einem Test wurden 5 bis 10 Tiere verwendet. Wegen der wechselnden Anzahl zu verarbeitender Schweinemägen und wegen des unterschiedlichen Reinheitsgrades der Testsubstanz auf den einzelnen Teststufen, war es zwar nicht möglich, pro Tier eine genau definierte Menge Gastrin zu injizieren, doch ließ sich unter Berücksichtigung der Ausbeute von Gastrin I und Gastrin II der prozentuale Anteil an Verunreinigungen etwa abschätzen und unter Zugrundelegung dieses Wertes eine Dosierung von ca. 20 bis 30 µg Gastrin/kg Körpergewicht festsetzen. Das Volumen der in physiologischer Kochsalzlösung enthaltenen Substanz betrug 1 ml je Tier.

4.1.1. Stimulatorische Eigenschaften der Antrumextrakte auf verschiedener Reinheitsstufe

Die in Abb. 1 und 2 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen die eindeutige Fähigkeit der Gastrinrohextrakte zur Stimulation der Magensaftsekretion. Außerdem ist zu erkennen, daß trüber Überstand nach der Isopropanolfällung infolge der Verschiebung des pH-Wertes vom Sollwert 3,9 gegen den Neutralpunkt eine vergleichsweise niedrige, aber dennoch nachweisbare Stimulationsfähigkeit besitzt, so daß eine pH-Wert-Korrektur zur Vermeidung von Gastrinverlusten unbedingt erforderlich war (vgl. dazu 3.2.3.). Das mit Kontrolle bezeichnete Säulendiagramm zeigt, daß physiologische Kochsalzlösung - bei den Testversuchen als Lösungsmittel für das Testmaterial benutzt - keine stimulatorischen Fähigkeiten besitzt. Der mit zunehmender Reinheitsstufe in Abb. 2 nachweisbare Anstieg der HCl-Sekretion muß nach den oben gegebenen Hinweisen als zufälliges Ergebnis gewertet werden.

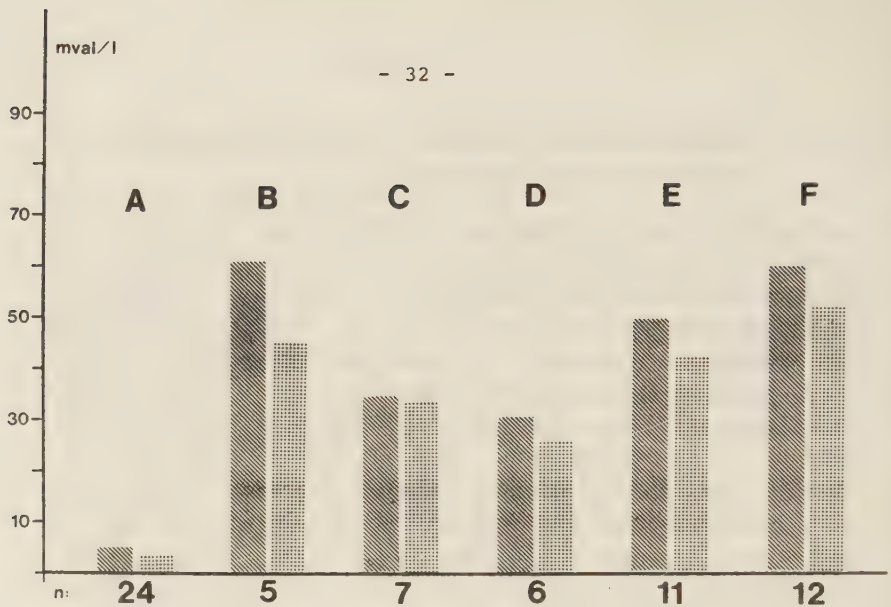


Abb. 1: Stimulatorische Eigenschaften der Antrumextrakte auf verschiedener Reinheitsstufe

A: Kontrolle, 1 ml 0,9 % NaCl ($s_1 \pm 24,62$; $s_2 \pm 22,04$)

B: Magenextrakt nach Eluierung aus DEAE-Zellulose
($s_1 \pm 15,50$; $s_2 \pm 14,70$)

C: Magenextrakt nach Eluierung aus DEAE-Zellulose, Fällung pH 3,9
($s_1 \pm 11,82$; $s_2 \pm 10,88$)

D: Trüber Überstand nach Fällung bei pH 3,9
($s_1 \pm 19,15$; $s_2 \pm 15,19$)

E: Magenextrakt nach Isopropanolfällung
($s_1 \pm 18,12$; $s_2 \pm 17,61$)

F: Magenextrakt nach Ätherextraktion
($s_1 \pm 17,05$; $s_2 \pm 17,73$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichung für freie HCl

s_2 = Standardabweichung für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

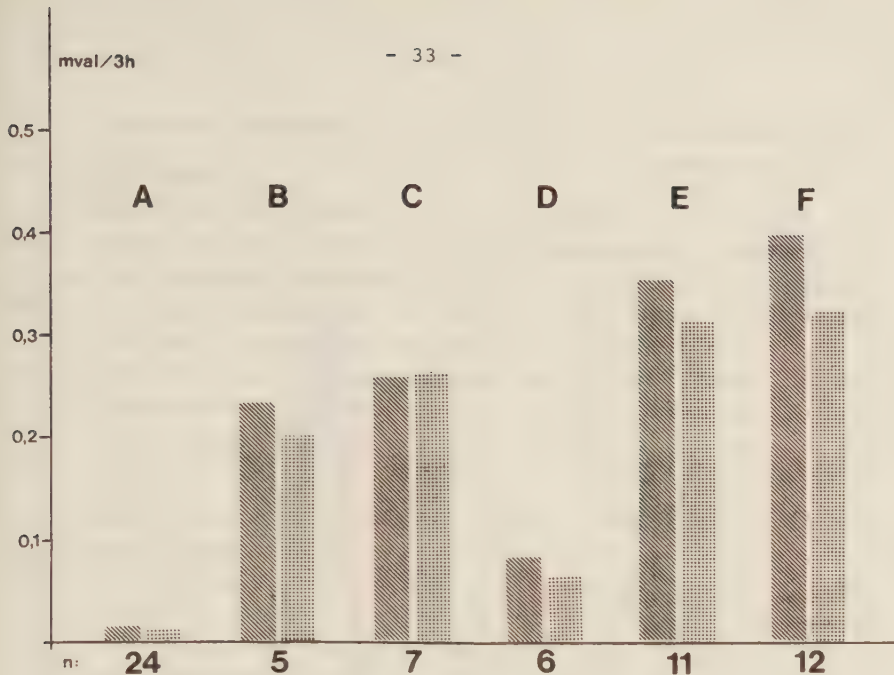


Abb. 2: Stimulatorische Eigenschaften der Antrumextrakte auf verschiedener Reinheitsstufe

A: Kontrolle, 1 ml 0,9 % NaCl ($s_1 \pm 0,126$; $s_2 \pm 0,143$)

B: Magenextrakt nach Eluierung aus DEAE-Zellulose
($s_1 \pm 0,073$; $s_2 \pm 0,105$)

C: Magenextrakt nach Eluierung aus DEAE-Zellulose, Fällung pH 3,9
($s_1 \pm 0,192$; $s_2 \pm 0,198$)

D: Trüber Überstand nach Fällung bei pH 3,9
($s_1 \pm 0,166$; $s_2 \pm 0,180$)

E: Magenextrakt nach Isopropanolfällung
($s_1 \pm 0,195$; $s_2 \pm 0,193$)

F: Magenextrakt nach Ätherextraktion
($s_1 \pm 0,208$; $s_2 \pm 0,315$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

4.1.2. Stimulatorisches Verhalten nach chromatographischer Reinigung

Die in Abb. 3 und 4 wiedergegebenen Chromatogramme der Extraktionssubstanz auf Sephadex G 50 bzw. auf AE-Zellulose können als repräsentativ für eine Vielzahl ähnlicher Diagramme gelten. Wie bereits erwähnt (vgl. 3.2.6.), war ihr charakteristischer Verlauf - von unbedeutenden Änderungen abgesehen - jederzeit reproduzierbar. Die auf der Abszisse angegebenen Zahlen bezeichnen die Fraktionsnummer. Wie aus der Abb. 4 hervorgeht, war die Ausbeute an Gastrin II etwa doppelt so hoch wie die an Gastrin I.

Die Abb. 5 und 6 geben Auskunft über das stimulatorische Verhalten der aus den Chromatogrammen ersichtlichen Peaks. Dabei bezeichnen die Diagramme A und B die gastrinhaltige Fraktion 48 bis 66 der Abb. 3 bei Testung unterschiedlicher Volumina (1 ml und 2 ml je Tier). E repräsentiert die Fraktionen 1 bis 105, den Beginn der Sammelperiode bei der Chromatographie mit AE-Zellulose (s. Abb. 4). Hier ist eine Stimulation nicht nachweisbar.

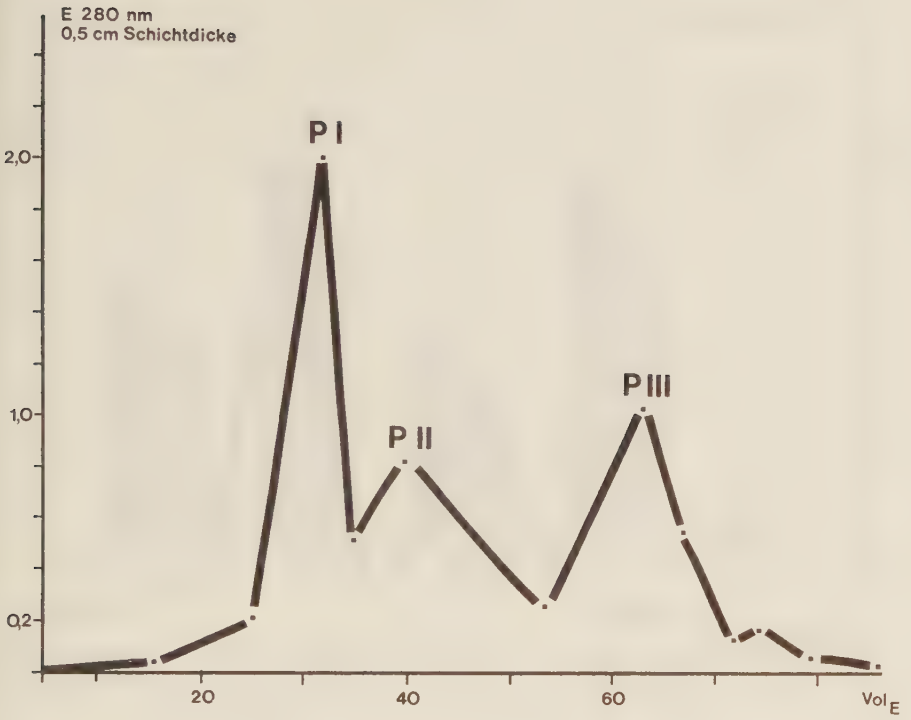


Abb. 3: Chromatogramm auf Sephadex G 50

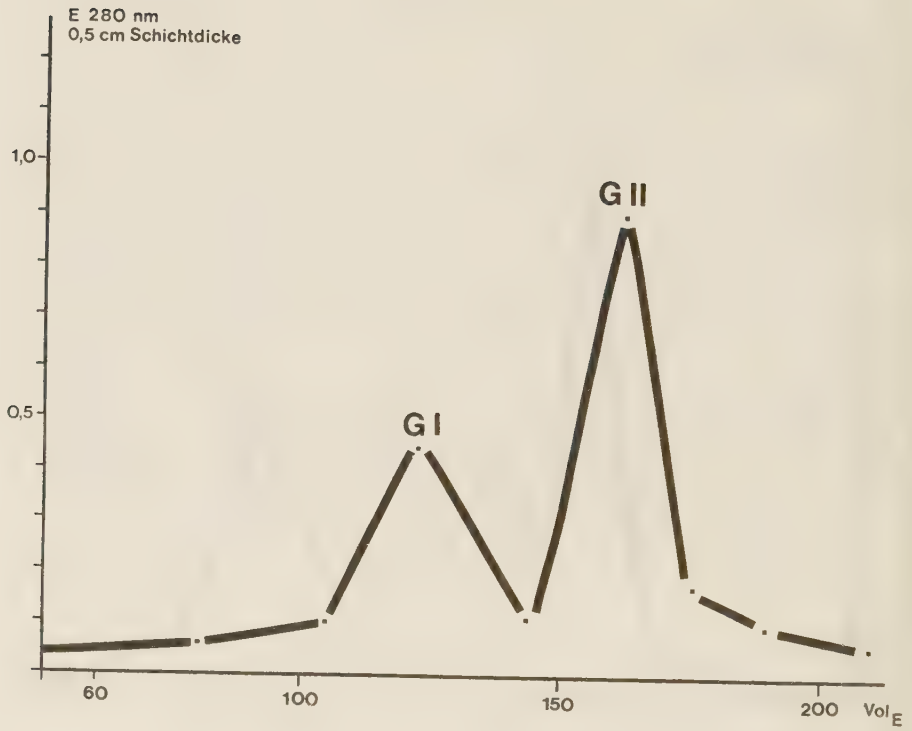


Abb. 4: Chromatogramm auf AE-Zellulose

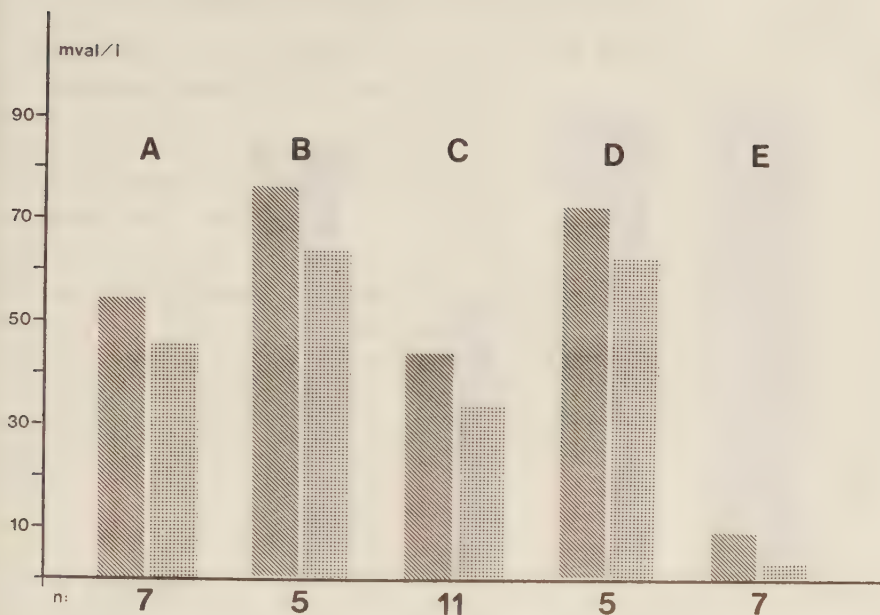


Abb. 5: Stimulatorisches Verhalten nach chromatographischer Reinigung auf Sephadex G 50 und AE-Zellulose

A: 1 ml Testsubstanz der Fraktionen 48 bis 66

($s_1 \pm 13,86$; $s_2 \pm 14,39$)

B: 2 ml Testsubstanz der Fraktionen 48 bis 66

($s_1 \pm 25,92$; $s_2 \pm 20,66$)

C: Gastrinaktivität von G I

($s_1 \pm 17,05$; $s_2 \pm 14,44$)

D: (Gastrinaktivität von G II

($s_1 \pm 21,88$; $s_2 \pm 16,94$)

E: Aktivitätsprüfung der Fraktionen 0 bis 105

($s_1 \pm 12,13$; $s_2 \pm 7,31$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

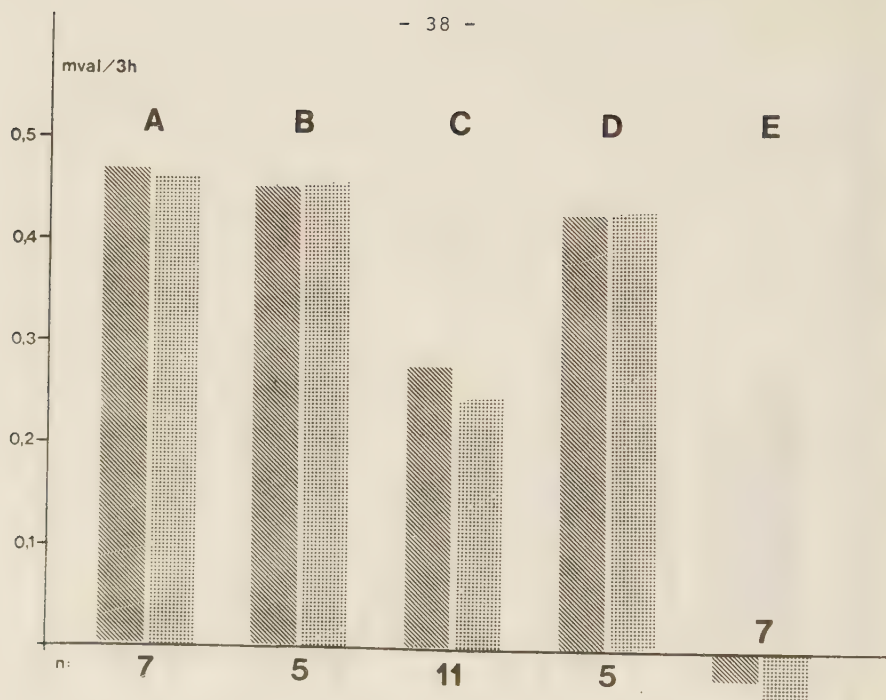


Abb. 6: Stimulatorisches Verhalten nach chromatographischer Reinigung auf Sephadex G 50 und AE-Zellulose

A: 1 ml Testsubstanz der Fraktionen 48 bis 66

($s_1 \pm 0,259$; $s_2 \pm 0,278$)

B: 2 ml Testsubstanz der Fraktionen 48 bis 66

($s_1 \pm 0,114$; $s_2 \pm 0,109$)

C: Gastrinaktivität von G I

($s_1 \pm 0,094$; $s_2 \pm 0,095$)

D: Gastrinaktivität von G II

($s_1 \pm 0,211$; $s_2 \pm 0,219$)

E: Aktivitätsprüfung der Fraktionen 0 bis 105

($s_1 \pm 0,141$; $s_2 \pm 0,173$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

4.2. Rückgewinnung von dem Urin zugegebenen Gastrin

Bevor die eigentlichen Extraktionsversuche begannen, war es notwendig, normalen, reinen Urin auf seine stimulatorischen Eigenschaften hin zu untersuchen. Die Darstellung berücksichtigt sowohl die Auswertung aller Daten als auch die nach Anwendung der schon erwähnten Selektionskriterien (SEELIG, 1972) erhaltenen Ergebnisse.

Wie aus Abb. 8 sehr deutlich hervorgeht, wird die stimulatorische Wirksamkeit des Gastrins auch nach fünfstündiger Lagerung des Urins bei Raumtemperatur in keiner Weise beeinflusst; die Auswertung ergab nahezu identische Werte. Auch die Verdünnung der Testsubstanz mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 2 korreliert im Diagramm mit einem fast 50 %-igen Wirkungsverlust.

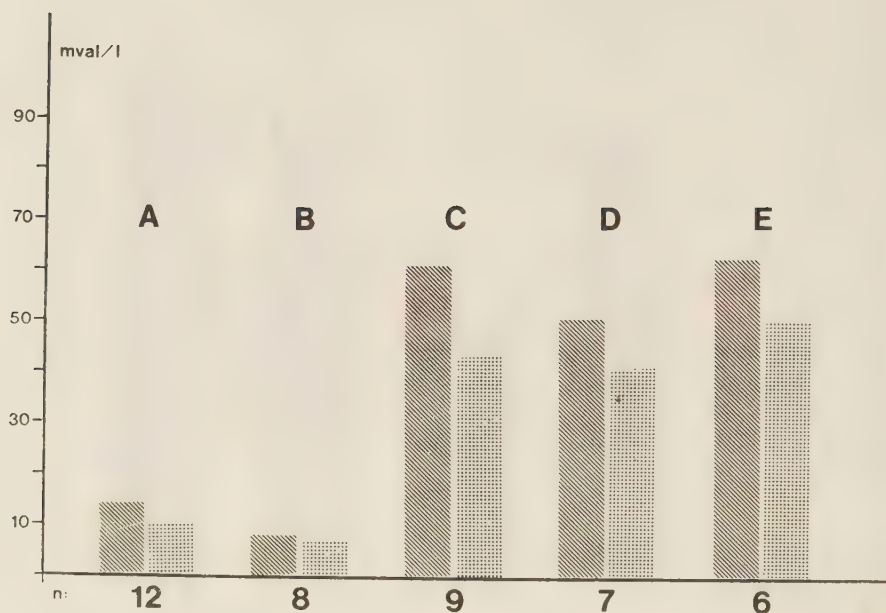


Abb. 7: Extraktion exogenen Gastrins aus Urin

A: Urin ohne Gastrin (Auswertung aller Daten)

($s_1 \pm 18,81$; $s_2 \pm 17,82$)

B: Urin ohne Gastrin (korrigierte Daten)

($s_1 \pm 21,61$; $s_2 \pm 20,04$)

C: Urin, exogen mit Gastrin versetzt

($s_1 \pm 23,41$; $s_2 \pm 20,52$)

D: Urin, exogen mit Gastrin versetzt, 5 Std. bei Raumtemperatur

($s_1 \pm 20,98$; $s_2 \pm 17,44$)

E: Urin, exogen mit Gastrin versetzt, 5 Std. bei Raumtemperatur

1 : 2 mit 0,9 % NaCl verdünnt ($s_1 \pm 31,94$; $s_2 \pm 24,01$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

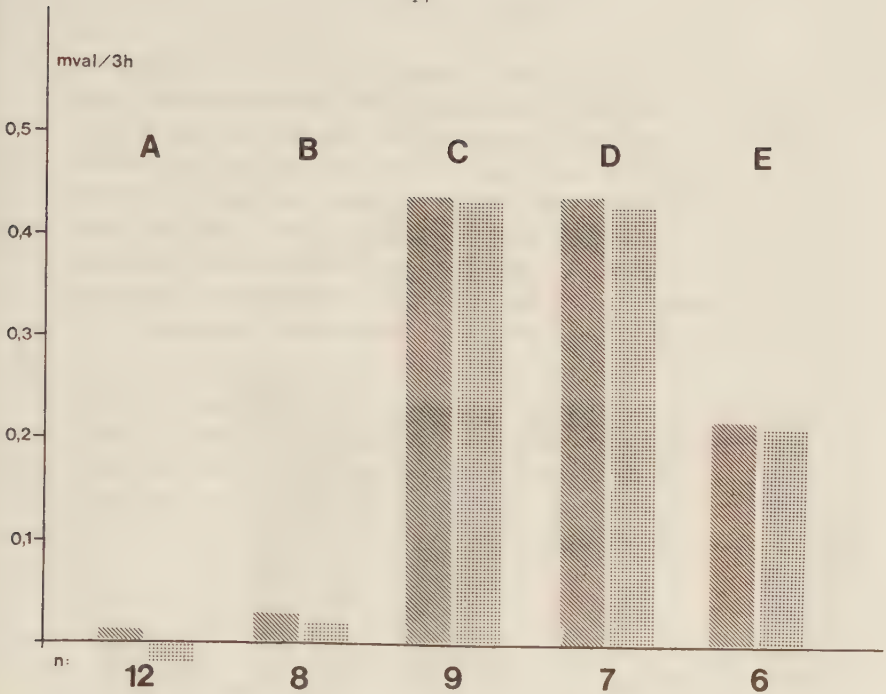


Abb. 8: Extraktion exogenen Gastrins aus Urin

A: Urin ohne Gastrin (Auswertung aller Daten)

($s_1 \pm 0,144$; $s_2 \pm 0,183$)

B: Urin ohne Gastrin (korrigierte Daten)

($s_1 \pm 0,176$; $s_2 \pm 0,197$)

C: Urin, exogen mit Gastrin versetzt

($s_1 \pm 0,275$; $s_2 \pm 0,289$)

D: Urin, exogen mit Gastrin versetzt, 5 Std. bei Raumtemperatur

($s_1 \pm 0,335$; $s_2 \pm 0,336$)

E: Urin, exogen mit Gastrin versetzt, 5 Std. bei Raumtemperatur

1 : 2 mit 0,9 % NaCl verdünnt ($s_1 \pm 0,158$; $s_2 \pm 0,150$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

Die Abb. 9 und 10 geben einen Überblick über die Versuche, das dem Urin hinzugefügte Gastrin wieder zu extrahieren. Dabei wird deutlich, daß sich das einmalige Eluierender mikrogranulären Zellulose als nicht ausreichend erwies, da die Werte sowohl der Salzsäurekonzentration als auch der Salzsäuresekretion für eine erhebliche Stimulationsfähigkeit nicht nur des NaOH-Eluats, sondern auch der DEAE-Zellulose sprachen. Außerdem ist zu erkennen, daß die daraufhin durchgeführte Modifikation der Versuchsordnung sehr gute Ergebnisse lieferte (vgl. hierzu 3.3.1).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Extraktion des dem Urin hinzugefügten Gastrins in allen Fällen möglich war. Die Resultate der Versuche läßt sogar vermuten, daß mit dieser Methode auch wesentlich geringere Gastrinkonzentrationen aus Urin extrahierbar sind.

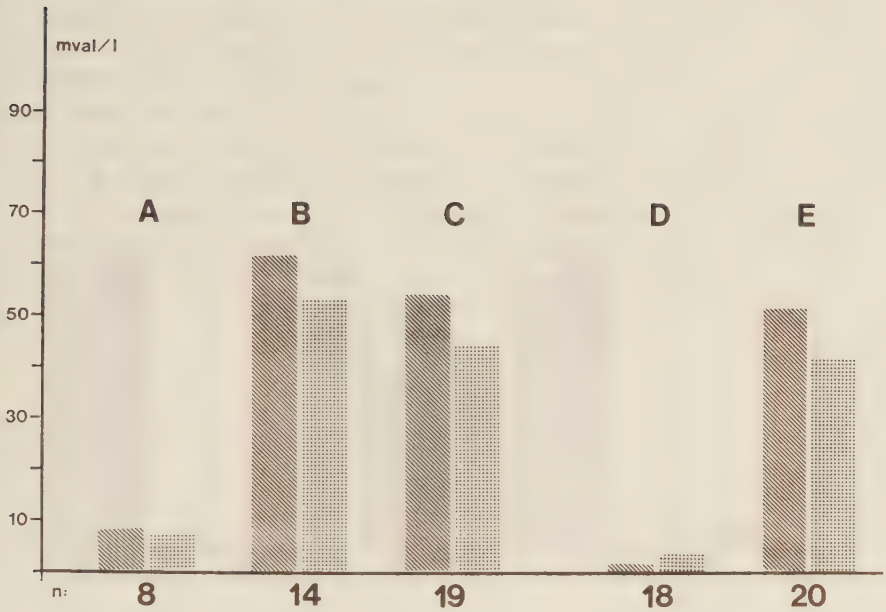


Abb. 9: Extraktionsversuche mit normalem, frischem Urin

A: Kontrolle, Urin ohne Gastrin (KD)

(s₁ ± 21,61; s₂ ± 20,04)

B: Urin und Gastrin nach DEAE-Zellulose, einmal eluiert

(s₁ ± 16,25; s₂ ± 16,64)

C: NaOH-Eluat, einmal eluiert

(s₁ ± 18,89; s₂ ± 15,15)

D: Urin und Gastrin nach DEAE-Zellulose, fünfmal eluiert

(s₁ ± 12,42; s₂ ± 11,48)

E: NaOH-Eluat, fünfmal eluiert

(s₁ ± 17,39; s₂ ± 15,66)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s₁ = Standardabweichungen für freie HCl

s₂ = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

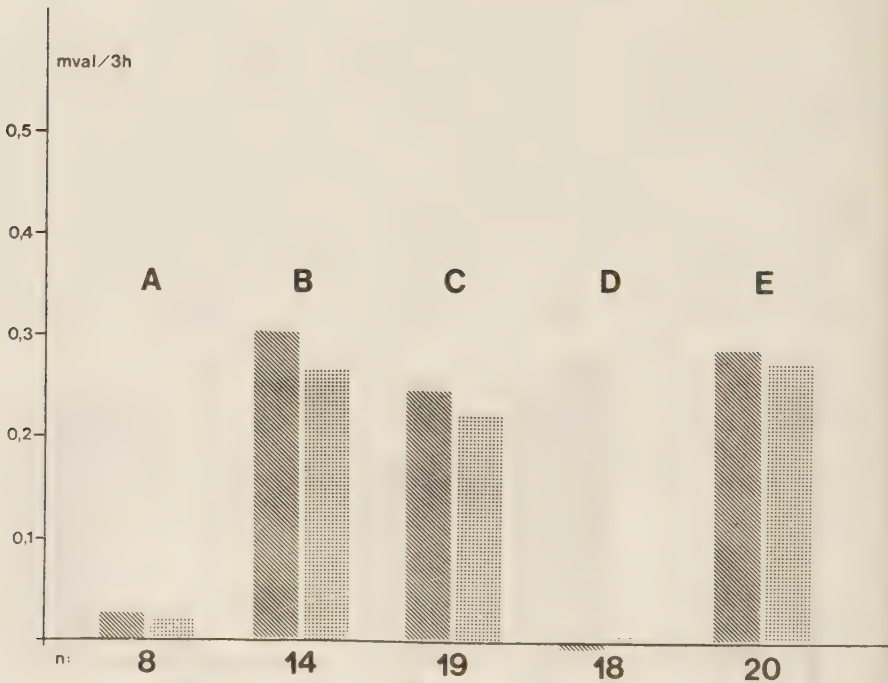


Abb. 10: Extraktionsversuche mit normalem, frischem Urin

A: Kontrolle, Urin ohne Gastrin (KD)

($s_1 \pm 0,176$; $s_2 \pm 0,197$)

B: Urin und Gastrin nach DEAE-Zellulose, einmal eluiert

($s_1 \pm 0,157$; $s_2 \pm 0,154$)

C: NaOH-Eluat, einmal eluiert

($s_1 \pm 0,164$; $s_2 \pm 0,174$)

D: Urin und Gastrin nach DEAE-Zellulose, fünfmal eluiert

($s_1 \pm 0,069$; $s_2 \pm 0,090$)

E: NaOH-Eluat, fünfmal eluiert

($s_1 \pm 0,108$; $s_2 \pm 0,106$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

Nachdem anhand dieser Versuche nachgewiesen werden konnte, daß eine Extraktion selbst geringster Mengen von Gastrin aus dem Urin möglich ist, folgte die chromatographische Trennung des Eluates auf Sephadex G 50. Wie das Chromatogramm der Abb. 11 erkennen läßt, sind hierbei - ähnlich wie bei den Chromatogrammen der Gastrinextraktion aus Schweinemägen - drei Peaks nachweisbar, die wiederum auf die Anwesenheit von Gastrin hin getestet wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Säulenchromatographie mit Schweineantraextrakten, erwies sich bei Testung der drei Peaks der erste als gestrinhaltig. Zur Kontrolle ist noch einmal der Wert für physiologische Kochsalzlösung, dem Lösungsmittel für die Testsubstanzen, mit angegeben.

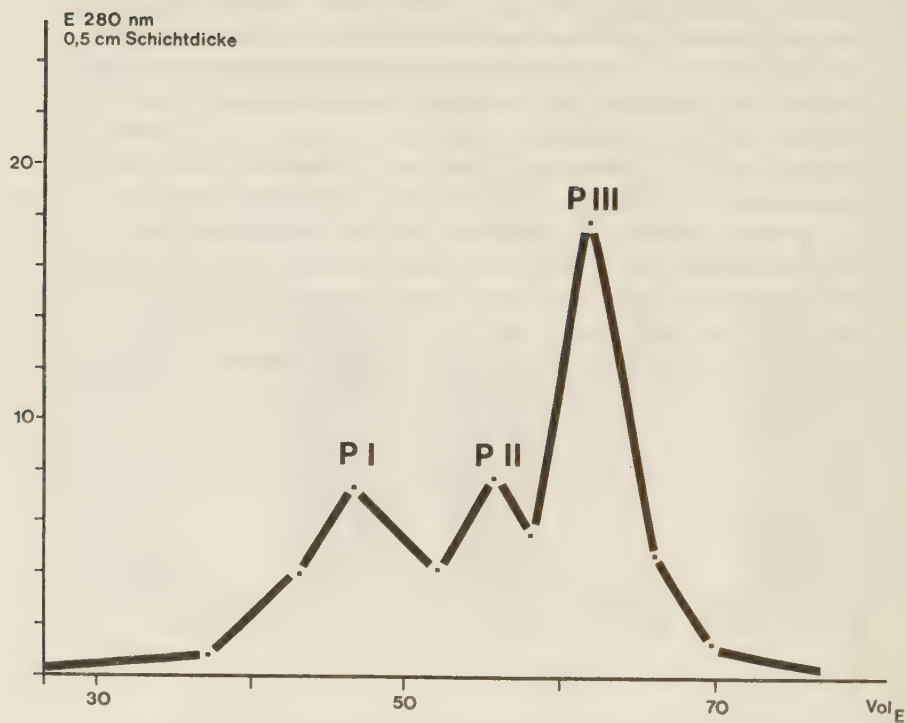


Abb. 11: Chromatogramm des normalen, mit Gastrin versetzten Urins auf Sephadex G 50

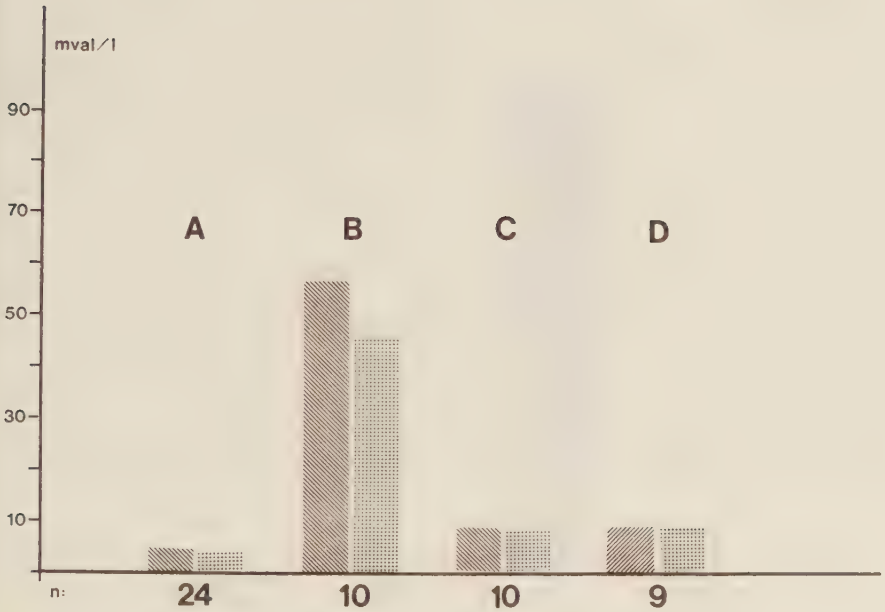


Abb. 12: Stimulatorisches Verhalten der Peaks nach Sephadex G 50

A: Kontrolle, 1 ml 0,9 % NaCl

($s_1 \pm 24,62$; $s_2 \pm 22,04$)

B: Peak I

($s_1 \pm 22,12$; $s_2 \pm 17,82$)

C: Peak II

($s_1 \pm 24,69$; $s_2 \pm 18,87$)

D: Peak III

($s_1 \pm 23,43$; $s_2 \pm 24,14$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

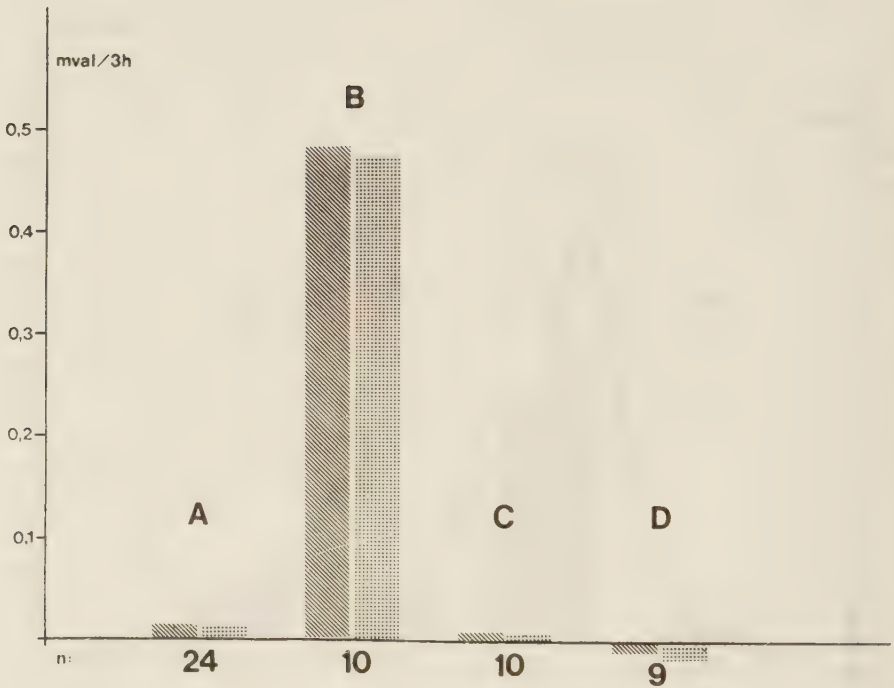


Abb. 13: Stimulatorisches Verhalten der Peaks nach Sephadex G 50

A: Kontrolle, 1 ml 0,9 % NaCl

($s_1 \pm 0,126$; $s_2 \pm 0,143$)

B: Peak I

($s_1 \pm 0,209$; $s_2 \pm 0,231$)

C: Peak II

($s_1 \pm 0,151$; $s_2 \pm 0,158$)

D: Peak III

($s_1 \pm 0,113$; $s_2 \pm 0,137$)

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

4.3. Gastrinextraktion bei Verarbeitung eines fraglichen Zollinger-Ellison-Urins

Nachdem der technische Ablauf der Extraktion exogenen Gastrins aus Urin erarbeitet worden war, sollte sich die klinische Erprobung der Anlage anschließen. Dafür war der Urin eines Patienten, nach dessen klinischer Symptomatik ein bestehendes Zollinger-Ellison-Syndrom in Erwägung gezogen werden mußte, gesammelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -18°C gelagert worden. Doch bereits der Tierversuch, ein sichere pathognomonisches Indiz, ließ Zweifel an der Diagnose aufkommen, da eine säurestimulierende Fähigkeit des Urins, wie Abb. 14 zeigt, nicht nachgewiesen werden konnte. Dennoch erfolgte eine Weiterverarbeitung, die diese Vermutung jedoch nur bestätigte. Hatte die Kurve des Chromatogramms bei der Behandlung des normalen Urins drei Gipfel gezeigt, so war diesmal lediglich ein einziger nachweisbar. Tierversuche mit unterschiedlicher Konzentration dieser Fraktion schlossen sich an (Einzelheiten vgl. 3.4.), wobei bemerkenswert ist, daß die unverdünnten Proben bei allen sechs ausgewerteten Tieren eine nahezu vollständige Hemmung der Magensaftsekretion hervorriefen (Volumen 0,5 ml). Mit steigender Verdünnung ließ sich diese ausgeprägte Inhibition zwar nicht mehr zeigen, doch ist aus Abb. 15 ersichtlich, daß von einer Säurestimulierung nicht gesprochen werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse mußte - auch im Hinblick auf die Veröffentlichungen der französischen Arbeitsgruppe um BONFILS und LAMBLING, die bei allen Patienten mit verifiziertem Zollinger-Ellison-Syndrom eine deutliche Magensaftstimulierung nach s.c. Injektion von Patientenurin beobachtete - die Diagnose in diesem Fall in Frage gestellt werden.

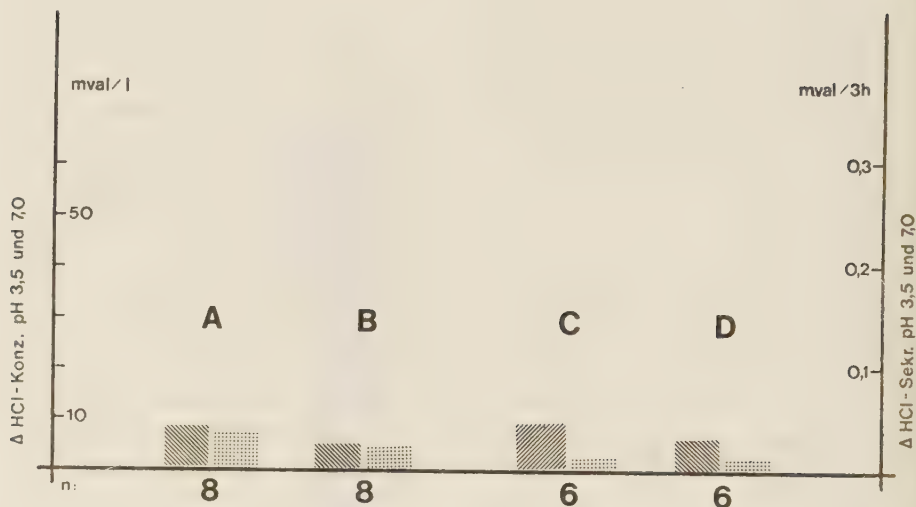


Abb. 14: Tierversuche mit Urin eines Patienten mit fraglichem Zollinger-Ellison-Syndrom

A: Kontrolle, Urin ohne Gastrin (KD); Konz. HCl pH 3,5 und 7,0
 $(s_1 \pm 21,61; s_2 \pm 20,04)$

B: Kontrolle, Urin ohne Gastrin (KD); HCl-Sekr. pH 3,5 und 7,0
 $(s_1 \pm 0,176; s_2 \pm 0,197)$

C: 1 ml Patientenurin (KD); Konz. HCl pH 3,5 und 7,0
 $(s_1 \pm 11,69; s_2 \pm 11,71)$

D: 1 ml Patientenurin (KD); HCl-Sekr. pH 3,5 und 7,0
 $(s_1 \pm 0,013; s_2 \pm 0,033)$

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

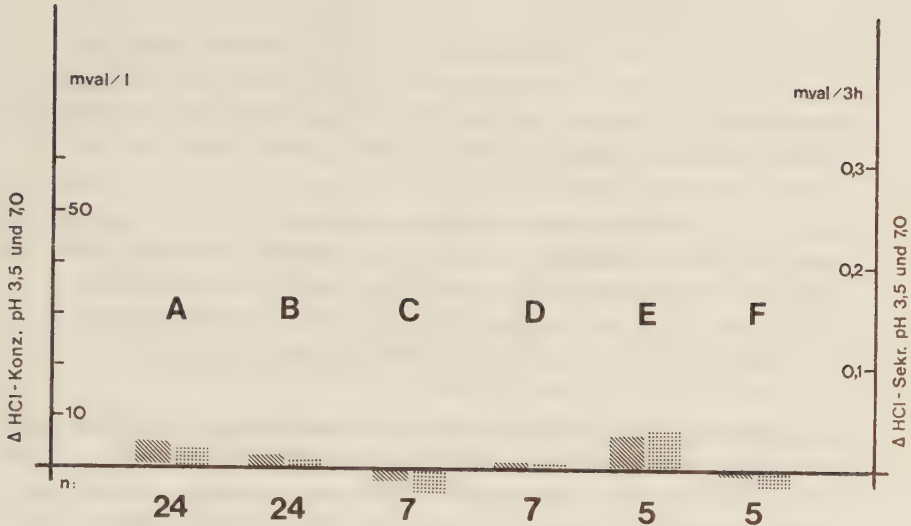


Abb. 15: Stimulatorisches Verhalten eines fraglichen Zollinger-Ellison-Urins nach Chromatographie auf Sephadex G 50

- A: Kontrolle, 1 ml 0,9 % NaCl (Konz. HCl pH 3,5 und 7,0)
 $(s_1 \pm 21,61; s_2 \pm 20,04)$
- B: Kontrolle, 1 ml 0,9 % NaCl (HCl-Sekr. pH 3,5 und 7,0)
 $(s_1 \pm 0,176; s_2 \pm 0,197)$
- C: Patientenurin 1 : 2 mit 0,9 % NaCl verdünnt (Konz.HCl pH 3,5 und 7,0)
 $(s_1 \pm 24,84; s_2 \pm 25,07)$
- D: Patientenurin 1 : 2 mit 0,9 % NaCl verdünnt (HCl-Sekr. pH 3,5 und 7,0)
 $(s_1 \pm 0,193; s_2 \pm 0,212)$
- E: Patientenurin 1 : 3 mit 0,9 % NaCl verdünnt (Konz. HCl pH 3,5 und 7,0)
 $(s_1 \pm 12,10; s_2 \pm 25,31)$
- F: Patientenurin 1 : 3 mit 0,9 % NaCl verdünnt (HCl-Sekr. pH 3,5 und 7,0)
 $(s_1 \pm 0,154; s_2 \pm 0,190)$

Schraffierter Block = Titration bei pH 3,5 (freie HCl)

Gepunkteter Block = Titration bei pH 7,0 (totale HCl)

s_1 = Standardabweichungen für freie HCl

s_2 = Standardabweichungen für totale HCl

n = Anzahl der Versuchstiere

5. Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind eng mit dem prinzipiellen Problem des renalen Abbaus und der Ausscheidung von Gastrin als Bestandteil des Gastrinstoffwechsels verbunden, einer Frage, zu der bislang jedoch lediglich Hypothesen aufgestellt werden können.

Für eine Beteiligung der Nieren am Gastrinstoffwechsel sprechen die Untersuchungen von JAFFE und NEWTON (1969 und 1971), die eine hohe Inkorporationsrate von radioaktiv markiertem ^{125}J -Gastrin in der Nierenrinde nach i.v. Gabe nachwiesen. Dabei kann jedoch nur vermutet werden, daß es sich um inaktives und metabolisiertes Gastrin handelt.

Der Nachweis einer renalen Inaktivierungsfähigkeit für Gastrin wurde in vitro durch SEELIG (1972) erbracht, der 90 Minuten nach Inkubation von Gastrin II mit partikelfreiem Überstand aus Rattennierenhomogenat einen vollständigen Wirkungsverlust des Gastrins feststellte.

Die Frage der Eliminierung von Gastrin infolge eines Wechselspiels von Filtrations-, Reabsorptions- und Sekretionsprozessen wird ebenfalls diskutiert. Theoretisch ist ein Erscheinen von Gastrin im Urin durchaus denkbar, denn die Basalmembran - bestehend aus fibrillären Strukturen mit Öffnungen von 30 bis $75 \text{ \AA}$ Durchmesser - stellt als Ultrafilter das eigentliche Diffusionshindernis für Plasma dar. Sie ist verantwortlich für den sog. Siebungseffekt: kleinmolekulare Substanzen werden im Glomerulum frei filtriert, mit wachsender Molekülgröße nimmt jedoch die Anzahl der filtrierten Moleküle immer mehr ab. Bildet man den Quotienten aus Filtratkonzentration und Plasmakonzentration, läßt sich zwischen ihm und dem Molekulargewicht eine umgekehrte Proportionalität zeigen. Siehe dazu Tab. 3.

Gastrin als Heptadekapeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 2.000 könnte also die Basalmembran nahezu frei passieren und, sofern keine tubuläre Reabsorption erfolgt, im Urin erscheinen.

Substanz	Molekulargew.	<u>Filtratkonz.</u> <u>Plasmakonz.</u>
Wasser	18	1,0
Harnstoff	60	1,0
Glukose	180	1,0
Inulin	5500	0,98
Myoglobin	17000	0,75
Hämoglobin	68000	0,03
Serum-Albumin	69000	0,01

Tab. 3: Aus R.F. Pitts: Physiology of the kidney and body fluids, Yearbook Medical Publishers Inc., 1963

Ähnliche Ergebnisse wurden seit 1958 durch die französische Arbeitsgruppe um BONFILS und LAMBLING publiziert. Sie wiesen nach, daß eine Magensaftstimulierung im Tierversuch mit Urin einer Normalperson nicht möglich ist. Außerordentlich interessant sind dagegen die Beobachtungen, daß unter pathologischen Verhältnissen, vor allem bei Vorliegen eines Zollinger-Ellison-Syndroms, die Magensaftsekretion so signifikant gesteigert ist, daß in diesen Fällen die Ausscheidung einer oder mehrerer Substanzen mit stimulatorischen Fähigkeiten in Erwägung gezogen werden muß, ohne über deren molekularen Aufbau Endgültiges sagen zu können.

Berücksichtigt man die geringe Halbwertszeit selbst nach unphysiologisch hohen Gastrindosen, spricht das für ein sehr gutes Gleichgewicht des Gastrinstoffwechsels, wobei noch nicht entschieden werden kann, welchem Organ die größere Bedeutung beim Abbau zugemessen werden muß, der Leber oder der Niere. Nach einer Veröffentlichung von REEDER und THOMPSON (1971) beträgt der Nüchternwert der Gastrinkonzentration im Serum bei urämischen Patienten durchschnittlich 137 ± 14 pg/ml (für Normalpersonen schwanken die Angaben zwischen 50 und 400 pg/ml, vgl. MCGUIGAN und TRUDEAU, 1968; BYRNES, YOUNG, CHRISHOLM und LAZARUS, 1970; MCGUIGAN und TRUDEAU, 1970), liegt also innerhalb des Bereichs der Norm. Demnach muß also die Kapazität der

anderen, am Katabolismus des Gastrins beteiligten Organe - vornehmlich der Leber - so groß sein, daß sie bei Niereninsuffizienz den Abbau des Hormons allein zu übernehmen vermögen. Beim Zollinger-Ellison-Syndrom steigt dagegen die Gastrinkonzentration im Serum so stark an, daß das Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau empfindlich gestört wird. Vielleicht könnte das daraufhin zu beobachtende Auftreten von Substanzen mit stimulatorischen Fähigkeiten im Urin der Patienten dahingehend gedeutet werden, daß infolge der Hypergastrinämie ein Gastrin-Schwellenwert der Niere überschritten worden ist und daraufhin Abbauprodukte des Hormons, vielleicht sogar das Hormon selbst, im Urin zusätzlich ausgeschieden werden. Die zahlreichen positiven Bioassays mit Urin von Patienten, bei denen ulcerogene Tumoren nachgewiesen werden konnten, sowie die Untersuchungen von BONFILS, VATIER und ACCARY (1970) scheinen diese Hypothese zu bestätigen.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Extraktion exogenen Gastrins aus normalem Urin mit Hilfe von Anionenaustauschern prinzipiell möglich ist. Damit wäre die Voraussetzung geschaffen, das vorhandene säurestimulierende Material im Urin der an Zollinger-Ellison-Syndrom erkrankten Patienten qualitativ zu gewinnen und auf seine Identität mit Gastrin zu überprüfen.

Der Ablauf der Arbeit wurde von folgenden Überlegungen bestimmt:

1. Voraussetzung für die Durchführung der Versuche war zunächst die Reindarstellung von Gastrin. Hierfür bot sich die von GREGORY und TRACY (1964) beschriebene Methode an. Ihr Aufbau sollte nachvollzogen und im Hinblick auf Änderungsmöglichkeiten geprüft werden.
2. Hauptbildungsstätte des Gastrins im Organismus ist der Anttrumanteil des Magens. Er sollte zur Reindarstellung des Hormons herangezogen werden. Wegen der benötigten großen Mengen fanden dabei Schweinemägen Verwendung. Die große Ähnlichkeit sowohl in der chemischen Struktur als auch in der Wirksamkeit im Organismus, erlauben jedoch eine unbe-

denkliche Reproduzierung der gewonnenen Ergebnisse auf Gastrin des Menschen (vgl. 2.2.).

3. Nach erfolgter Reindarstellung von Gastrin aus Schweinemägen sollte geprüft werden, ob durch Modifizierung der Extraktionsanlage die Rückgewinnung von Gastrin, das dem Urin einer Normalperson zugesetzt worden war, möglich ist, oder ob die hohe Ionenkonzentration des Urins die Anlagerung von Gastrin an DEAE-Zellulose hemmt.
4. Die Untersuchung von Urin eines an Zollinger-Ellison-Syndrom erkrankten Patienten sollte sich anschließen.

Die Reindarstellung von Gastrin aus Schweinemägen ließ sich nach eingehender Erprobung der einzelnen Extraktionsschritte ohne größere Schwierigkeiten durchführen. Wesentlich erscheint in diesem Zusammenhang, daß der konstante Kurvenverlauf der Chromatogramme schließlich als Maß für die Anwesenheit von Gastrin gewertet werden konnte und damit Aktivitätsuntersuchungen bei Ratten überflüssig machte.

Die Rückgewinnung von Gastrin, das dem Urin einer gesunden Versuchsperson zugesetzt wurde, ließ sich erfolgreich durchführen. Allerdings waren dafür erhebliche Modifizierungen des Extraktionsablaufs notwendig. Ähnlich wie bei der Reindarstellung des Gastrins, dienten auch hier zunächst Rattenversuche als beweisendes Kriterium für die Anwesenheit von Gastrin, auf sie konnte später jedoch verzichtet werden.

Die Erprobung des Verfahrens mit Urin eines an Zollinger-Ellison-Syndrom erkrankten Patienten wäre als Ergänzung interessant gewesen. Wie bereits unter 2.5. dargelegt wurde, gehört zur eindeutigen Diagnosestellung "Zollinger-Ellison-Syndrom" entweder die quantitative Bestimmung der Gastrinkonzentration im Serum oder der Nachweis einer magensaftstimulierenden Fraktion im Urin des Patienten. Dabei ist die erste Untersuchung zweifellos die elegantere. Sie hat inzwischen an großen Kliniken als Radioimmunoassay Eingang in die Diagnostik gefunden und ist für routinemäßige Untersuchungen die Methode der Wahl. Da bei der Durchführung der Arbeit eine kommerzielle Verbreitung der in der Herstellung aufwendigen Gastrinantikörper je-

doch noch nicht möglich war, wurde das Urinbioessay als aussagekräftige Methode benutzt. Es ermöglicht nach den Erfahrungen von BONFILS, LAMBLING et al. eindeutige Ergebnisse, doch setzt es ein erfahrenes Operationsteam voraus, das in der Praxis wohl in den seltensten Fällen zur Verfügung stehen dürfte. So war es eine Frage der Zeit, wann das Urinbioessay durch das Radioimmunoessay abgelöst werden würde.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Reindarstellung von Gastrin I und Gastrin II aus Schweinemögen beschrieben. Methodisch wird weitgehend nach der von GREGORY und TRACY 1964 veröffentlichten Anordnung verfahren.

Der Nachweis für die prinzipielle Möglichkeit einer Rückgewinnung exogenen Gastrins aus menschlichem Urin wird erbracht und die für den Versuchsablauf notwendigen Modifizierungen angegeben.

Über die Untersuchungen mit Urin eines Patienten, bei dem die Verdachtsdiagnose "Zollinger-Ellison-Syndrom" gestellt worden war, wird berichtet.

Zum Nachweis von Gastrin wird die von BONFILS et al. angegebene Methode der transduodenalen Magenfistel für Sekretionsstudien an der Ratte verwendet.

Literaturverzeichnis

- ACCARY, J.P., P.C. SIZONENKO, M. DUBRASQUET, S. BONFILS:
Etudes sur la gastrine synthétique radioactive (^{131}J ou ^{125}J) injectée par voie intraveineuse chez le rat.
C.R. Soc. Biol. 163 (1970) 2538
- ANDERSON, J.C., M.A. BARTON, R.A. GREGORY, P.M. HARDY,
G.W. KENNER, J.K. McLEOD, J. PRESTON, R.C. SHEPPARD,
J.S. MORLEY: The antral hormone gastrin. Synthesis of
gastrin. Nature, (Lond.) 204 (1964) 933
- BECKER, V.: Das Zollinger-Ellison-Syndrom. Demonstration und
Deduktion. Revue Intern. d'Hépatologie, Tome XV, Nr. 3
(1965)
- BECKER, V.: Das Zollinger-Ellison-Syndrom. Wiener klin. Wochen-
schrift, 79. Jg. Nr. 29/30, 577-579 (1967)
- BECKER, V.: Das Zollinger-Ellison-Syndrom. Fortschritte der
Medizin, 88. Jh. Nr. 18, 764-768 (1970)
- BEGER, H.G., C. WITTE, M. MEVES, E. KRAAS: The effect of the
liver on the gastric secretion stimulated with penta-
gastrin and gastrin II. 2nd Symposium European Gastric
Club, Erlangen 1970, im Druck
- BERSON, S.A., R.S. YALOW: Nature of immunoreactive gastrin
extracted from tissues of gastrointestinal tract.
Gastroenterology 60 (1971) 215
- BONFILS, S., G. ROSSI, G. LAMBLING: Etude de la sécrétion
gastrique du rat par fistule duodénale. Rév. franc.
Etud. clin. biol. 3 (1958) 977
- BONFILS, S., BADER, J.-P., DUBRASQUET, M. und LAMBLING, A.:
Dépistage, dans les urines humaines, de substances
existant la sécrétion gastrique du rat. Soc. de Bio-
logie 259-263 (1963)
- BONFILS, S., J. VATIER, J.P. ACCARY: Bioassay for gastrin
(P.S.U.) and its theoretical and clinical significance.
In: Origin. Chemistry, Physiology and Pathophysiology
of the Gastrointestinal Hormones, hrsg. von W. Creutz-
feldt, Schattauer, Stuttgart 1970 (S. 141)

- BUSSOLATI, C. und PEARSE, A.G.E.: Immunofluorescent localization of the gastrin-secretion G cell in the pyloric antrum of the pig. *Histochemie*, 21, 1-4 (1970)
- BYRNES, D.J., YOUNG, D.J. CHISHOLM, L. LAZARUS: Serum gastrin in patients with peptic ulceration. *Brit. med. J.* 1970/II, 626
- CAVALLERO, C. und SOLCIA, A.: Cytological and cytochemical aspects of istet pathology in the Zollinger-Ellison syndrome. *Rev. Intern. d'Hépatologie* 15, 517-526 (1965)
- CLENDINNEN, B.G., W.D. DAVIDSON, B.M. JACKSON, J.C. THOMPSON: Renal inactivation of gastrin. *Brit. J. Surg.* 57 (1970) 864
- EDKINS, J.S.: On the chemical mechanism of gastric secretion. *Proc. roy. Soc. Med.* 76 (1905) 376
- EDKINS, J.S.: The chemical of gastric secretion. *J. Physiol.* 34 (1906) 133
- GHOSH, M.N., H.O. SCHILD: Continous recording of acid gastric secretion in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* 13 (1958) 54
- GILLESPIE, I.E., M.I. GROSSMAN: Gastric secretion of acid in response to portal and systemic venous injection of gastrin. *Gastroenterology* 43 (1962) 189
- GREGORY, H., P.M. HARDY, D.S. JONES, G.W. KENNER, R.C. SHEPPARD: The antral hormone gastrin. Structure of gastrin. *Nature. (Lond.)* 204 (1964) 931
- GREGORY, R.A., H.J. TRACY: The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. *Gut* 5 (1964) 103
- GREGORY, R.A., H.J. TRACY: Some aspects of the chemistry of gastrin. In: *Origin, chemistry, physiology and pathophysiology of the gastrointestinal hormones*, hrsg. von W. Creutzfeldt; Schattauer, Stuttgart 1970 (S. 73)

- GREGORY, R.A., H.J. TRACY, K.L. AGARWAL, M.I. GROSSMAN:
Aminoacid constitution of two gastrins isolated from
Zollinger-Ellison tumor tissue. Gut 10 (1969) 603
- GREGORY, R.A., H.J. TRACY, J.M. FRENCH, W. SIRCUS: Extraction
of a gastrinlike substance from a pancreatic tumour in
a case of Zollinger-Ellison syndrome. Lancet 1960 I,
1045
- GREGORY, R.A., H.J. TRACY, M.I. GROSSMAN: Human Gastrin:
Isolation of two gastrins from human antral mucosa
Nature (Lond.) 209 (1966) 853
- HALTER, F.: Gastrointestinale Hormone und ihre Bedeutung für
die Diagnostik. Schweiz. med. Wschr. 238 (1969)
- HARPER, A.A.: The affect of extracts of gastric and intestinal
mucosa on the secretion of HCl by the cat's stomach.
J. Physiol. 105 (1946) 310
- JAFFE, B.M., W.T. NEWTON: Distribution and localization of
radioiodinated gastrin. Surg. Forum 20 (1969) 312
- JORPES, J.E., O. JALLING, V. MUTT: A method for the prepara-
tion of gastrin. Biochem. J. 52 (1952) 327
- KOMAROV, S.A.: Gastrin. Amer. J. Physiol. 123 (1938) 121
- KOMAROV, S.A.: Studies on Gastrin. Rev. Canad. Biol. 1 (1942)b
377
- LAI, K.S.: Studies on gastrin. Gut 5 (1964) 327
- LAMBLING, A., S. BONFILS, J.P. BADER, M. DUBRASQUET: Le pou-
voir sécrétagogue gastrique des urines de l'homme
(P.S.U.). Gastroenterologia 103 (1965) 152
- LEBEDINSKAJA, S.I.: Über die Magensekretion bei Eckschen
Fistelhunden. Z. ges. exp. Med. 88 (1933) 264
- LICK, R.F., K.H. WELSCH, W. HART, W. BRÜCKNER, D. BALSER,
TH. GÜRTNER: Zur sekretorischen Funktion des Magens
nach Injektion von Histamin, Gastrin und synthetischem
Tetrapeptid in den großen Kreislauf und in die Pfort-
ader. I. Gastroent. 5 (1967) 7

- LINTHE, H.: Gastrin und seine Inaktivierung unter besonderer Berücksichtigung seiner Inaktivierung im Serum. Inaugural-Dissertation (1973)
- LÜDCKE, J.B.P.: Untersuchungen zur Inaktivierung von Gastrin durch partikelfreie Überstände aus Leberhomogenaten. Inaugural-Dissertation (1972)
- MAKHLOUF, G.M.: Effects of gastrin and its derivatives in man. Fed. Proc. 27 (1968) 1322
- McGUIGAN, J.E.: Immunochemical studies with synthetic human gastrin. Gastroenterology 54 (1968 a) 1005
- McGUIGAN, J.E.: Gastric mucosal intracellular localization of gastrin by immunofluorescence. Gastroenterology 55 (1968 b) 315
- McGUIGAN, J.E., M.H. GREIDER: Correlative, immunochemical and light microscopic studies of the gastrin cell of the antral mucosa. Gastroenterology 60 (1971) 223
- McGUIGAN, J.E., B.M. JAFFE, W.T. NEWTON: Immunochemical measurements of endogenous gastrin release. Gastroenterology 59 (1970) 499
- McGUIGAN, J.E. and LANDOR, J.H.: Studies of gastrin physiology using antibodies to gastrin. Gastroenterology 60, Nr. 4, 785 (1971)
- McGUIGAN, J.E., W.L. TRUDEAU: Immunochemical measurement of elevated levels of gastrin in the serum of patients with pancreatic tumors of the Zollinger-Ellison variety. New Engl. J. Med. 278 (1968) 1308
- McGUIGAN, J.E., W.L. TRUDEAU: Studies with antibodies to gastrin. Radioimmunoassay in human serum and physiological studies. Gastroenterology 58 (1970) 139
- NEWTON, W.T., B.M. JAFFE: The fate of intravenously administered radiolabeled gastrin. Surgery 69 (1971) 34
- ORLOFF, M.J., H. VILLAR-VALDES, H. ROSEN, A.G. THOMPSON, J.G. CHANDLER: Humoral mediation of the intestinal phase of gastric secretion and of acid hypersecretion associated with portocaval shunts. Surgery 66 (1969) 118

- PEARSE, A.G.E., G. BUSSOLATI: Immunofluorescence studies of the distribution of gastrin cells in different clinical states. Gut 11 (1970) 646
- PEARSE, A.G.E., I. COULLING, B. WEAVERS, S. FRIESEN: The endocrine polypeptide cells of the human stomach, duodenum and jejunum, Gut 11 (1970) 649
- PLEWE, D.: Die Inaktivierung von Gastrin II und Pentagastrin durch partikelfreie Überstände aus Rattennierenhomogenat. Inaugural-Dissertation (1973)
- REEDER, J.C. und THOMPSON, D.D.: Effect of hemodialysis on serum gastrin levels in uremic patients. Gastroenterology 60, 795 (1971)
- SCHRIEFERS, K.H., H.W. SCHREIBER, G. ESSER: Zur Frage der Magensaftsekretion und des Magen-Duodenalulcus beim Pfortaderhochdruck der Lebercirrhose und nach portocavalen Shunt-Operationen. Langenbecks Arch. klin. Chir. 302 (1963) 702
- SEELIG, H.P.: Gastrin und die Theorie seiner Wirkungen. Med. Welt 18 (1967) 2275
- SEELIG, H.P., LINTHE, H., LÜDCKE, J.B.P., PLEWE, D., MÜLLER, U., WÜSTLING, H.-U., KESSLER, M.: Inaktivierung von Pentagastrin (ICI 50, 123) durch Humanserum und Leberhomogenat. Klin. Wschr. 48, 1069-1070 (1970)
- SEELIG, H.P.: Gastrin. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1972)
- SOLCIA, E., VASSALLO, G., SAMPIETRO, R.: Endocrine cells in the antro-pyloric mucosa of the stomach. Zelforsch. 81, 474-486 (1967)
- SOLCIA, E., G. VASSALLO und C. CAPELLA: Studies on the G cells of the pyloric mucosa, the probable site of gastrin secretion. Gut 10, 379 (1969)
- TAUBER, S., L. MADISON: The isolation and characterization of porcine gastrin. J. biol. Chem. 240 (1965) 645

- THOMPSON, J.C., D.D. REEDER, W.D. DAVIDSON, A.C. CHARTERS, W.L. BRÜCKNER, C.A.E. LEMMI, J.H. MILLER: Effect of hepatic transit of gastrin, pentagastrin and histamine measured by gastrin secretion and by assay of hepatic vein blood. *Ann. Surg.* 170 (1969) 493
- UVNÄS, B.: Some chemical properties of the gastric secretory excitant from the pyloric mucosa. *Acta. physiol. scand.* 6 (1943 b) 117
- UVNÄS, B.: Further attempts to isolate a gastric secretory excitant from the pyloric mucosa of pigs. *Acta. physiol. scand.* 9 (1945 a) 296
- UVNÄS, B.: The presence of a gastric secretory excitant in the human gastric and duodenal mucosa. *Acta. physiol. scand.* 10 (1945 b) 97
- YALOW, R.S., S.A. BERSON: Size and charge distinctions between endogenous human plasma gastrin in peripheral blood and heptadecapeptide gastrins. *Gastroenterology* 58 (1970) 609
- YALOW, R.S., S.A. BERSON: Further studies on the nature of immunoreactive gastrin in human plasma. *Gastroenterology* 60 (1971) 203
- ZOLLINGER, R.M., E.H. ELLISON: Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. *Ann. Surg.* 142 (1966) 709
- ZOLLINGER, R.M., ELLIOT, D.W., ENDAHL, G.L., GRANT, G.N., GOSWITZ, J.T. and TAFT, D.A.: Origin of the ulcerogenic hormone in endocrine induced ulcer. *Ann. Surg.* 156, 570-578 (1962)

Nachsatz

An dieser Stelle möchte ich denen danken, die durch ihre Unterstützung zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben, Herrn Priv. Doz. Dr. H.P. Seelig für die freundliche Anvertrauung des Themas, die sachkundigen Hinweise und sein reges Interesse an der Durchführung der Arbeit,

meinen ehemaligen Kommilitonen, Herrn Dr. Hubert Linthe, Herrn Dr. Jörg Lüdcke und Herrn Dr. Dieter Plewe, für ihre Hilfe bei den Tieroperationen

und Herrn Dipl.-Ing. Joachim Engel für die vielfältigen Anregungen beim Aufbau der Extraktionsanlage.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Frau Prof. Dr. S. Grohme, da ihre Bereitschaft zur Übernahme der Arbeit deren Abschluß erst möglich machte.

Lebenslauf

Geboren am 3.2.1942 in Halle/Saale.

Vater Gewerbeoberlehrer, Mutter Hausfrau.

Reifeprüfung im März 1962.

Musikstudium (Hauptfach Klavier) vom WS 1962 bis SS 1964
mit Staatsprüfung zum Privatmusiklehrer.

Medizinstudium vom WS 1964 bis zum WS 1972 mit medizinischem
Staatsexamen an der Freien Universität Berlin.

Zur Zeit Assistenzarzt an der Anästhesie-Abteilung des
St. Gertrauden-Krankenhauses.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198